

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

Identification et caractérisation de la polycystine-1 dans l'épithélium
intestinal humain

Par
Marie-Pierre Boucher
Anatomie et Biologie cellulaire

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie cellulaire

Août 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-00227-1

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-00227-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES ILLUSTRATIONS	VI
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	IX
RÉSUMÉ	XI

I-INTRODUCTION

1. L'INTESTIN HUMAIN.....	1
1.1 L'axe crypte-villosité et ses généralités.....	1
1.2 La polarité des cellules épithéliales du système gastro-intestinal.....	2
1.3.1 Les jonctions serrées.....	3
1.3.2 Les jonctions d'ancrage	4
2. LA POLYCYSTINE-1(PC-1).....	8
2.1 ADPKD.....	8
2.2 LE GÈNE PKD1	10
2.3 LA PROTÉINE POLYCYSTINE-1	11
2.4 L'importance de la polycystine-1 dans le rein	15
2.4.1 Souris transgénique KO pour le gène <i>PKD1</i> (in vivo).....	15

2.4.2 Effet de la surexpression de la polycystine-1 dans les MDCK (in vitro)	15
2.4.3 Expression endogène de la polycystine-1 et son emplacement dans les MDCK.....	16
2.4.4 Implication de la polycystine-1 dans la polarité des cellules épithéliales de rein.....	17
3. LE CILIUM PRIMAIRE.....	20
3.1 Caractéristiques générales.....	20
4. HYPOTHESE ET OBJECTIFS	23

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. TISSU HUMAIN	24
2. CULTURE CELLULAIRE	24
2.1. LES CELLULES CACO-2/15	24
2.2 LES CELLULES HIEC-6.....	25
3. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.....	26
3.1 TISSUS HUMAINS	26
3.2 CELLULES	26

4. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	29
4.1 Solubilisation des protéines cellulaires	29
4.1.1. TAMPON DE SOLUBILISATION LAEMMLI	29
4.1.2. TAMPON DE SOLUBILISATION DE LYSE/STABILISATION DU CYTOSQUELETTE.....	29
4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	30
4.3 Immunodétection des protéines	31
5. RT-PCR	33
6. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	33
7. MICROSCOPIE À BALAYAGE	34
8. PERFUSION	35
9. INHIBITION ET RESTAURATION DES JONCTIONS CELLULAIRES.....	35

III-RÉSULTATS

1. EXPRESSION DE LA POLYCYSTINE-1 DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL HUMAIN.....	38
2. LA LOCALISATION DE LA POLYCYSTINE-1 DANS LES JONCTIONS ADHÉRENTES ET LES DESMOSOMES.....	45

2.1 La co-localisation de la polycystine-1 avec des protéines de jonction	45
2.2 La localisation de la polycystine-1 par microscopie électronique.....	52
2.3 Isolement de la polycystine-1 comme étant une protéine associée au cytosquelette	56
2.4 Inhibition et restauration des jonctions cellulaires.....	59
 3. LA POLYCYSTINE-1 DANS LES HIEC E-CADHÉRINE	61
 4. IDENTIFICATION DU CILIUM PRIMAIRE DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL	63
 5. LA FONCTIONNEMENT DU CILIUM PRIMAIRE DANS LES HIEC	69
 6. LA CO-LOCALISATION DE LA POLYCYSTINE-1 ET LE CILIUM PRIMAIRE DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL HUMAIN.....	71

IV-DISCUSSION

1. LA POLYCYSTINE-1 SE RETROUVE DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL HUMAIN ET CO-LOCALISE AVEC LES JONCTIONS ADHÉRENTES ET LES DESMOSOMES.	75
2. LA LOCALISATION DE LA POLYCYSTINE-1 VARIE SELON L'ÉTAT DE POLARITÉ DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES HUMAINES.	77

3. L'EMPLACEMENT DE LA POLYCYSTINE-1 AU NIVEAU DES JONCTIONS INTERCELLULAIRES POURRAIT L'IMPLIQUER DANS L'ADHÉSION CELLULAIRE ET LA SIGNALISATION.	79
3.1 <i>Adhésion cellulaire</i>	79
3.2 <i>Les voies de signalisation</i>	81
4. LE CILIUM PRIMAIRE EST UN ORGANITE ASSOCIÉ AU FOND DE LA CRYPTÉ DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL HUMAIN.	83
5. POURQUOI IL N'Y A PAS DE PHÉNOTYPE KYSTIQUE DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL HUMAIN?	85
6. LA POLYCYSTINE-1 À LA BASE DU CILIUM PRIMAIRE INTESTINAL POURRAIT ÊTRE FONCTIONNELLE.	86
V-CONCLUSION	88
REMERCIEMENTS	90
BIBLIOGRAPHIE	91

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I-INTRODUCTION

Figure 1.	Les jonctions intercellulaires	6
Figure 2.	La structure moléculaire et les interactions protéiques des jonctions intercellulaires principales de cellules épithéliales.	7
Figure 3.	Illustration d'un rein normal et d'un rein cystique.....	9
Figure 4.	Le gène <i>PKD1</i>	13
Figure 5.	Le produit du gène <i>PKD1</i> : la polycystine-1	14
Figure 6.	Illustration de la dédifférenciation partielle et de la perte de la polarité dans les cellules ADPKD.	19
Figure 7.	La structure du cilium primaire.	22

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 8.	Représentation schématique de l'inhibition et la restauration des jonctions intercellulaires.....	37
-----------	---	----

III-RÉSULTATS

Figure 9.	Immunodétection de la polycystine-1 (PC-1) dans l'intestin foetal et adulte humain.....	41
-----------	---	----

Figure 10. Modèles cellulaires récapitulant l'axe crypte-villosité d'un intestin grêle humain	42
Figure 11. Immunodétection de la polycystine-1 (PC-1) dans les modèles cellulaires intestinaux	43
Figure 12. Étude non-quantitative de l'expression de l'ARNm et de la protéine PC-1.	44
Figure 13. Étude de la co-localisation (pour jonction adhérente) de la polycystine-1 et la E-cadhérine dans l'intestin foetal et adulte humain	48
Figure 14. Étude de la co-localisation (pour desmosome) de la polycystine-1 et de la ZK-31 dans l'intestin foetal et adulte humain	49
Figure 15. Étude de la co-localisation (pour jonction adhérente) de la polycystine-1 et la E-cadhérine dans les Caco-2/15.....	50
Figure 16. Étude de la co-localisation (pour desmosome) de la polycystine-1 et de la ZK-31 dans les Caco-2/15.....	51
Figure 17. Immunolocalisation de la polycystine-1 dans une jonction adhérente de l'épithélium de l'intestin foetal humain par microscopie électronique à transmission	54
Figure 18. Immunolocalisation de la polycystine-1 dans les desmosomes de l'épithélium de l'intestin foetal humain par microscopie électronique à transmission.....	55

Figure 19.	Isolement de la polycystine-1 comme étant une protéine associée au cytosquelette.....	58
Figure 20.	Inhibition et restauration des jonctions intercellulaires sur les cellules Caco2-15	60
Figure 21.	L'introduction de la E-cadhérine dans les cellules HIEC et la localisation de la PC-1	62
Figure 22.	Spécificité de l'anticorps de la tubuline- α acétylée pour le cilium primaire du rein fœtal humain	65
Figure 23.	Immunodétection de cilium primaire dans les modèles cellulaires de l'épithélium intestinal humain	66
Figure 24.	Étude de microscopie à balayage (SEM) afin d'identifier la présence de cilia primaire à la surface des cellules HIEC ...	67
Figure 25.	Immunodétection du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain in vivo.	68
Figure 26.	Validation de la fonctionnalité du cilium primaire retrouvée à la surface des cellules HIEC	70
Figure 27.	Immunodétection de la polycystine-1 à la base du cilium primaire des cellules HIEC	72

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Note : Comme dans la littérature en général, les acronymes anglophones sont utilisés pour éviter la confusion. Dans la liste des abréviations, le nom est d'abord donné en français puis en anglais (entre parenthèse dans le but de montrer la provenance de l'acronyme).

ADPKD	La polykystose rénale autosomique dominante (autosomal dominant polycystic kidney disease)
AM	Acétoxyméthyl
ARPKD	La polykystose rénale autosomique récessive (autosomal recessive polycystic kidney disease)
EGTA	Éthylène glycol tétra acide acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
FBS	Sérum de veau foetal (Foetal bovine serum)
GPS	Site protéolytique du récepteur couplé à la protéine G (G-protein-coupled receptor proteolytic site)
HIEC	Cellule épithéliale intestinal humaine (human intestinal epithelial cell)
IgG	Immunoglobuline G
KO	Délétion génétique (Knock out)
LDL-A	Lipoprotéine de basse densité (Low density lipoprotein)
MDCK	Madin-Darby canine kidney
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
pb	Paire de base
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffer saline)

POLYCYSTINE-1	Polycystine-1 (Polycystin-1)
POLYCYSTINE-2	Polycystine-2 (polycystin-2)
PKC- α	Protéine kinase C alpha
PKD	Polykystose rénale (polycystic kidney disease)
REJ	Receptor for egg jelly
RT-PCR	Transcriptase inverse - réaction en chaîne en présence de polymérase (reverse transcriptase- polymerase chain reaction)
rpm	Révolutions par minutes
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SEM	Microscopie à balayage (scanning electron microscopy)
TCF/LEF	T Cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor
v/v	volume/volume
ZO	Zonula occludens

RÉSUMÉ

La polycystine-1 (PC-1) jouerait un rôle important pour la polarisation et la différenciation terminale des cellules épithéliales rénales. En effet, une mutation invalidant le gène encodant la polycystine-1 entraîne une polykystose rénale dans laquelle les cellules épithéliales deviennent partiellement dédifférenciées, hyperprolifératives et hyperapoptotiques, en plus de démontrer une altération dans la sécrétion des fluides.

Dans l'intestin, le renouvellement constant des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité est un processus dynamique qui requiert la coordination d'éléments qui régulent la prolifération, la polarisation et la différenciation. Les protéines et les facteurs (croissance et transcription) qui régulent ces processus cellulaires sont incompris au niveau mécanistique ou tout simplement inconnus.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la polycystine-1 est impliquée dans l'acquisition et le maintien du phénotype polarisé et différencié des cellules épithéliales intestinales humaines. Dans la présente étude, nous avons voulu déterminer 1) L'expression et la localisation de la polycystine-1 dans l'épithélium intestinal humain *in vivo* et dans les modèles cellulaires qui récapitulent l'axe crypte-villosité. 2) La variabilité de l'expression de la polycystine-1 selon l'état de polarité des cellules épithéliales intestinales. 3) La présence du cilium primaire au niveau de l'épithélium intestinal humain. 4) La localisation de la polycystine-1 au niveau du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain.

À l'aide d'un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1, nous avons en premier lieu démontré que la polycystine-1 est présente dans les cellules de l'épithélium intestinale humain *in vivo* tout le long de l'axe crypte-villosité et ce peu importe le stade de développement de l'intestin humain. De plus nous avons montré qu'elle était précisément localisée dans les jonctions adhérentes et dans les desmosomes par microscopie électronique et par des études de co-localisation avec des molécules de jonctions. Le co-marquage demeure même après un traitement au Triton X-100 et lors de l'inhibition et de la restauration des jonctions intercellulaires par un traitement à l'EGTA 4 mM et au CaCl_2 1.8 mM dans les cellules polarisées Caco-2/15. Par la localisation de la polycystine-1 aux jonctions intercellulaires *in vivo* et dans notre modèle cellulaire Caco-2/15, un rôle au niveau de la signalisation et dans l'adhésion cellulaire est envisagée. L'importance de ces processus cellulaires dans la

gestion de la polarité, de la prolifération et de la différenciation dans l'épithélium intestinal humain est fondamental.

Dans un deuxième volet, nous avons démontré que l'expression de la polycystine-1 varie selon l'état de polarité des cellules épithéliales intestinales. Pour les cellules non-polarisées, les HIEC, la polycystine-1 se localise au niveau intracellulaire. Pour les cellules polarisées, les Caco-2/15, la polycystine-1 se retrouve au contact cellule-cellule.

En plus de se retrouver dans les jonctions adhérentes et dans les desmosomes, nous avons localisé la polycystine-1 à la base du cilium primaire des cellules HIEC. Le cilium primaire a été caractérisé pour la première fois dans l'intestin humain avec un anticorps reconnaissant la tubuline- α acétylée. Il se localise dans les cellules épithéliales de la crypte de l'intestin humain *in vivo* et dans les cellules intestinales HIEC où sa fonctionnalité a été démontrée par des expériences de perfusion. Le cilium primaire dans les cryptes de l'intestin humain pourrait avoir des rôles primordiaux tant aux niveaux des cellules souches que de la régulation de la prolifération.

L'ensemble de ces résultats a donc permis de démontrer la présence de la polycystine-1 dans l'épithélium intestinal humain et de suggérer un rôle probable dans l'initiation et le maintien la polarité et la différenciation terminale de ces cellules.

I-INTRODUCTION

1. *L'intestin humain*

1.1 L'axe crypte-villosité et ses généralités

L'intestin humain est un excellent modèle pour l'étude de la prolifération et de la différenciation. Plusieurs modèles cellulaires intestinaux humains permettent de récapituler l'axe crypte-villosité et ainsi faciliter l'étude de l'intestin grêle (Pageot L.P., 2000.). L'axe crypte-villosité est l'unité fonctionnelle de l'intestin humain. Cet axe possède deux compartiments bien distincts, la crypte et la villosité, possédant des caractéristiques et fonctions bien différentes. Elle est composée de différentes populations de cellules : les cellules absorbantes, entéroendocrines, à mucus et de Paneth. La crypte se compose de cellules prolifératives et très peu différenciées tandis que la villosité comprend des cellules différenciées fonctionnelles. Ces différentes cellules ont une origine commune provenant des cellules souches du fond de la crypte. Le renouvellement constant et dynamique des différentes cellules qui composent cette unité fonctionnelle s'effectue dans une intervalle de deux à sept jours (Babyatsky M.W. et Podolsky D.K., 1999, Brittan M et Wright N.A., 2002).

1.2 La polarité des cellules épithéliales du système gastro-intestinal

Les cellules épithéliales du système gastro-intestinal sont impliquées dans le transport de nombreuses molécules dont les ions et les macromolécules. L'habileté de transporter vectoriellement différentes molécules à travers des compartiments, apicaux et baso-latéraux, découle de la polarité de ces cellules épithéliales. Les cellules épithéliales sont dites polarisées, lorsque leur membrane plasmique est séparée en deux domaines fonctionnels distincts, soit la membrane apicale ou baso-latérale. Les trois mécanismes indispensables à l'organisation et au maintien de la polarité épithéliale sont la restriction par les jonctions serrées, l'immobilisation du cytosquelette et le transport vectoriel permettant l'acheminement de molécules à la surface apicale ou baso-latérale des cellules épithéliales (Le Gall A.H. et al., 1995). Les protéines associées au cytosquelette telles que les molécules de jonction ont, en conséquence, une importance fondamentale dans l'établissement et le maintien de cette polarité épithéliale.

1.3 Les jonctions cellulaires

Les complexes de jonction sont importants pour maintenir le phénotype et le transport vectoriel des cellules épithéliales intestinales. Les jonctions cellulaires spécialisées se retrouvent au contact cellule-cellule ou cellule-matrice (figure 1A). Dans ce travail, les complexes de jonction cellule-cellule uniquement seront abordés. Les jonctions serrées (*zonula occludences*) et les jonctions d'ancrage (jonction adhérente (*zonula adherens*) et desmosomes (*macula adherens*) sont les principales jonctions cellulaires permettant l'adhésion cellule-cellule dans l'épithélium humain (figure 1B).

1.3.1 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont uniques aux cellules épithéliales. Une seule jonction de ce type est retrouvée au niveau apical de chaque cellule épithéliale. Sa localisation concorde parfaitement avec sa fonction. Ce complexe de jonction est une barrière physique à perméabilité sélective délimitant le domaine apical du domaine baso-latéral. Elle empêche aussi la diffusion latérale des constituants de la membrane apicale et baso-latérale. Cette jonction cellulaire est constituée d'un complexe comprenant plusieurs protéines dont la ZO-1, la ZO-2, la ZO-3, les claudines et les occludines (Cereijido M. et al., 2000) (figure 2A).

1.3.2 Les jonctions d'ancrage

1.3.2.1 JONCTIONS ADHÉRENTES (*ZONULA ADHERENS*)

Les jonctions adhérentes sont des jonctions cellulaires extrêmement importantes dans l'organisation tissulaire lors du développement, mais également dans le maintien du tissu au cours du stade adulte (Yap A.S. et al., 1997). Ce complexe de jonction se retrouve juste en-dessous de la jonction serrée sous forme de ceinture. Un rôle d'adhésion entre les cellules lui est conféré. Cette jonction est aussi formée d'un complexe de plusieurs protéines dont la E-cadhérine et les caténines (Perez-Moreno M. et al., 2003) (figure 2B). La formation d'homodimères de E-cadhérine (calcium dépendante) est essentiel à l'élaboration de la jonction adhérente. La zonula adherens fait un lien avec l'actine du cytosquelette par l'intermédiaire de la protéine α -caténine .

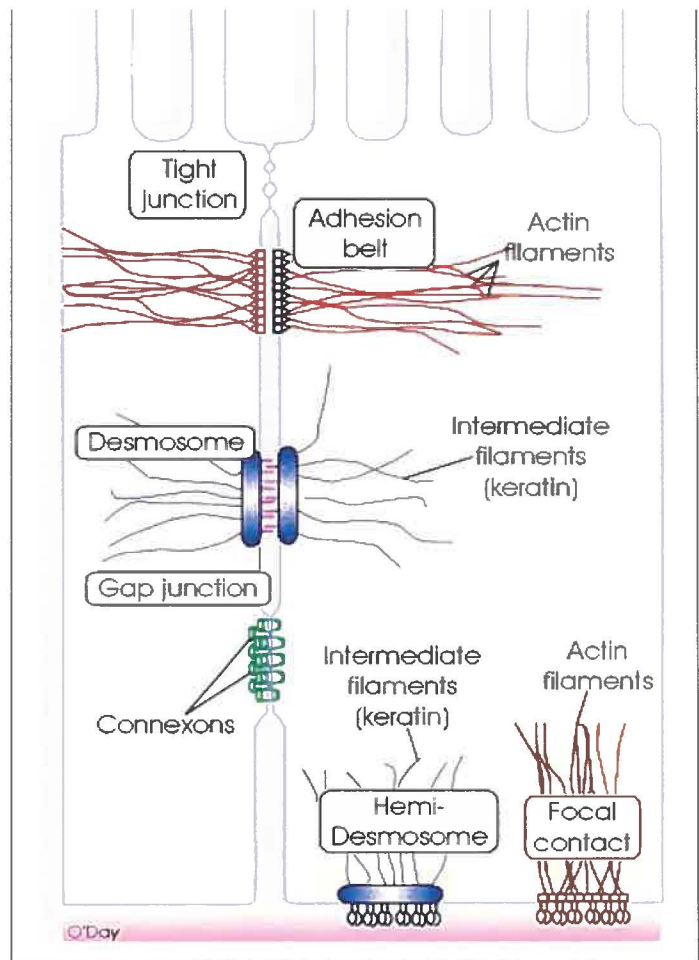
3.2.2 DESMOSOMES (*MACULA ADHERENS*)

Les desmosomes sont des jonctions cellulaires permettant également le contact cellule-cellule. Une importance vitale a été discernée à ces jonctions. Une maladie mortelle de la peau, *pemphigus*, se déclare si les protéines desmosomales sont altérées (maladie résultant de la production d'anticorps contre leurs propres protéines desmosomales) (Alberts et al., 2002). Ces jonctions cellulaires sont nombreuses et se retrouvent sous la

jonction adhérente. Elles sont liées au cytosquelette, plus précisément aux filaments intermédiaires, par des liaisons homophiliques et hétérophiliques de protéines calcium-dépendantes de la famille des cadhérines (desmogléine et desmocolline). Ce complexe de jonctions est aussi constitué de protéines telles que la desmoplakine et plakoglobuline (Huber O., 2003 ; Alberts et al., 2002) (figure 2C). L'interaction des desmosomes avec le cytosquelette permet la transmission des forces appliquées sur une cellule à sa voisine. Cette interaction contribue à orienter les filaments en réponse aux forces mises en jeu sur la cellule. Ceci permet donc à la cellule de répondre à des stress mécaniques.

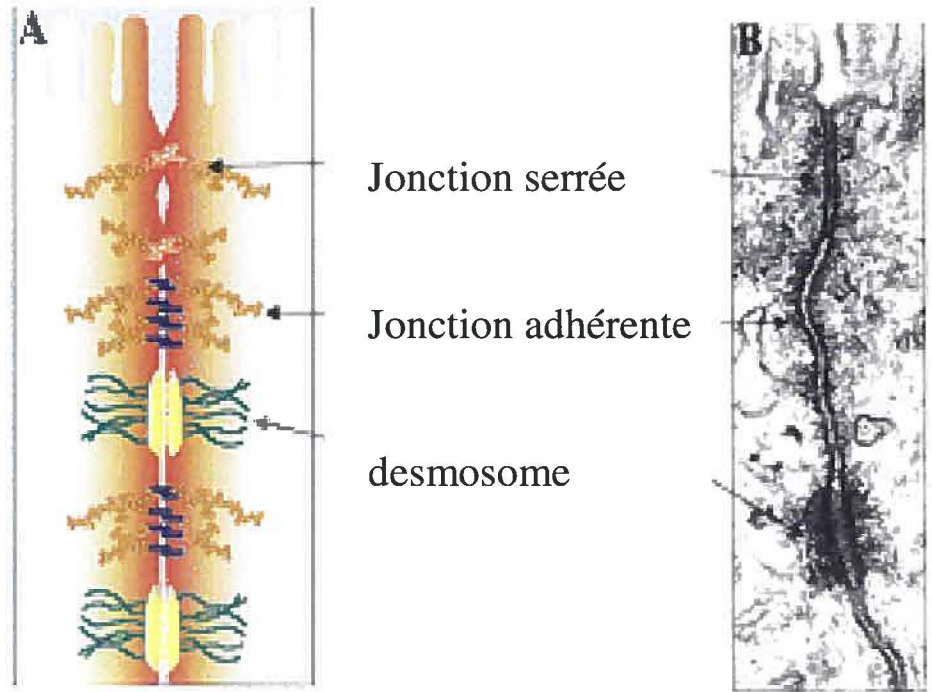
Figure 1. Les jonctions cellulaires A) Représentation des différentes jonctions cellulaires présentes au niveau des cellules épithéliales : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes, les jonctions communicantes et les hémidesmosomes. B) Diagramme des trois principaux types de jonctions cellulaires au contact cellule-cellule des cellules épithéliales. Représentation par microscopie électronique de la structure de la jonction serrée, de la jonction adhérente et de desmosomes.

A



B

Danton H., 2002



Perez-Moreno M. et al., 2003

Figure 2. La structure moléculaire et les interactions protéiques des jonctions intercellulaires principales de cellules épithéliales. A) Jonctions serrées : représentation des interactions possibles au niveau des protéines formant les jonctions serrées (ZO-1, ZO-2, ZO-3, claudines et occludines) B) Jonctions adhérentes : jonctions cellulaires basées sur l'interaction des E-cadhérine (calcium-dépendantes) et d'autres protéines afin d'établir un lien avec l'actine et les microtubules du cytosquelette. C) Desmosomes : un lien avec les filaments intermédiaires est réalisé par des protéines jonctionnelles calcium-dépendantes, la desmogléine et la desmoplakine . La plakoglobine et la desmoplakine font également partie du complexe de jonction desmosomal.

The diagram illustrates the molecular organization of the tight junction complex and its associated proteins. On the left, the cell membrane is shown with a network of **ACTIN** filaments and **SPECTRIN** proteins. Below the membrane, **FODRIN** is depicted. The tight junction complex itself consists of **CLAUDINS** and **OCCLUDINS**. **CLAUDINS** are transmembrane proteins with **NH₂** and **COOH** termini. **OCCLUDINS** are also transmembrane proteins with **NH₂** and **COOH** termini. **OCCLUDINS** are linked to **VAP-33** and **JAM** (Junctional Adhesion Molecule). **JAM** is a transmembrane protein with **SS** (disulfide bond) linkages. Other proteins shown include **ZAK**, **ZO-1**, **ZO-2**, **ZO-3**, **ASIP**, **ZONAB**, **CINGULINS**, and **4.1R**. The diagram also includes a legend for the proteins: **Rab3b** (small circle), **Rab13** (large circle), **7H6** (large circle), and **AP-6** (large circle).

Cereijido M. et al., 2000

[illegible]

Perez-Moreno M. et al., 2003

The diagram illustrates the molecular structure of a desmosome. It shows the plasma membrane as a horizontal boundary. On the extracellular side, two transmembrane proteins, desmoglein (yellow) and desmocollin (green), are embedded in the membrane. On the cytoplasmic side, these proteins are connected to a network of intermediate filaments (blue). The connection involves plakoglobin (pink) and desmoplakin (blue), which link the transmembrane proteins to the intermediate filaments. The cytoplasm is labeled as the region below the plasma membrane.

2. La polycystine-1(PC-1)

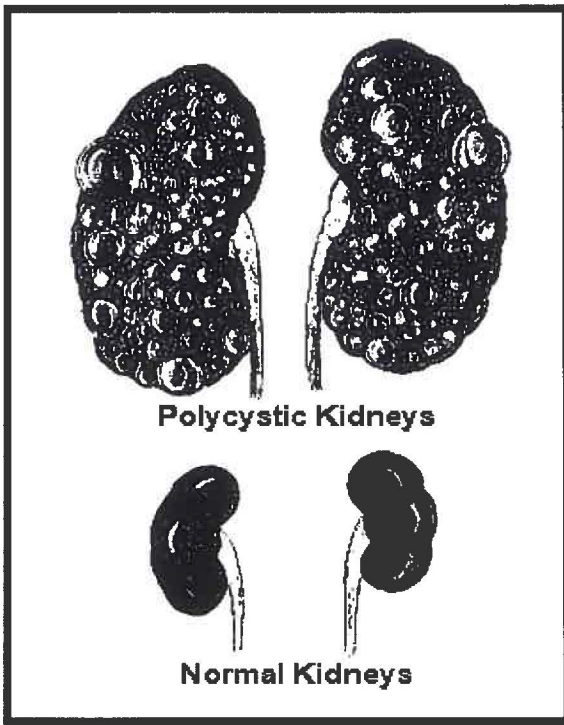
2.1 ADPKD

La PKD (polycystic kidney disease) est une maladie génétique affectant la population générale à une fréquence d'environ 1 sur mille (Forrensteiner et al., 1999 ; Gabow, 1993). Elle peut se présenter de façon dominante, ADPKD (autosomal dominant polycystic kidney disease) ou récessive, ARPKD (autosomal recessive polycystic kidney disease). La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est la forme la plus commune de la PKD. Ce syndrome se caractérise au niveau physiologique par des perturbations de la polarité et des fonctions spécifiques des cellules épithéliales rénales tubulaires amenant éventuellement à des kystes « fluid-filled » dans les néphrons de façon asymétrique (figure 3A et 3B) (Sutters M. et Germino G.G, 2003). L'évènement primaire qui donne lieu à la formation du phénotype kystique n'est pas encore connu jusqu'à ce jour. Diverses manifestations extra-rénales sont également observées dont un incidence de diverticuloses coliques chez les 2/3 des patients (surtout les dialysés) (Perrone R.D., 1997). Au niveau moléculaire, les recherches démontrent que la mutation des gènes *PKD1* et *PKD2* sont les causes directes de l'apparition de cette maladie génétique. L'initiation de la formation de

Figure 3. Illustration d'un rein normal et d'un rein cystique. A) La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est caractérisées par des lésions kystique au niveau du rein. Le nombre de kystes peut devenir tellement important que la masse du rein passe de 200g à 5 kg.

B) Rein polycystique extrait d'une femme de 48 ans atteint de la polykystose rénale autosomique dominante.

A



PKD access center, 1998

B



Witzgall R, 2002

de kystes repose sur une mutation somatique où la délétion de la seconde allèle est observée (Grantham J.J., 2001) qui s'explique par le modèle « two-hits » (Reeders S., 1992 ; Pei Y., 2001). Le phénotype de la maladie est le même si la mutation est sur le gène *PKD1* ou sur le gène *PKD2*. Il est intéressant de mentionner que la majorité des cas d'ADPKD, soit environ 85%, est due à une mutation du gène *PKD1* (Stein M.P., 2002). Au niveau rénal, si la polycystine-1 et/ou la polycystine-2 sont altérées, il est possible d'observer une prolifération anormale des cellules épithéliales tubulaires, mais également la production et la dégradation anormale de la matrice extracellulaire et la perte partielle de la polarité de la cellule (Sutters M. et Germino G.G, 2003).

2.2 Le gène *PKD1*

Le gène *PKD1* a été localisé sur le petit bras (p) du chromosome 16 (13.3) (figure 4A) (Reeders S.T. et al., 1985). Ce n'est qu'en 1995 que le gène *PKD1* a été cloné (International polycystic kidney disease consortium, 1995). Ce gène utilise 14.2 kb pour la région codante et est réparti en 46 exons sur un total de 53 kb (figure 4B). Le produit du gène *PKD1* est la polycystine-1 (PC-1). Les mutations touchant le gène *PKD1* sont de plusieurs natures. Des mutations « non-sens », « faux-sens » et « de déphasage » rendent la protéine non-fonctionnelle ou disfonctionnelle. En se référant au tableau de la figure 3C, il est possible de voir que les mutations du gène *PKD1* ne sont

pas observées sur un locus particulier, mais peuvent se localiser sur la majorité des exons du gène. Une excellente compilation des différentes mutations possibles a été réalisée par l'équipe du Dr. Peter Harris (Rossetti et al., 2002).

2.3 La protéine polycystine-1

Le gène *PKD1* code pour une protéine transmembranaire putative, polycystine-1 (PC-1), d'un poids moléculaire d'environ 480 kDa (figure 5). Son extrémité N-terminal de 3000 acides aminés contient un domaine LRR (leucine rich repeat), un domaine lectine, un domaine LDL-A (low density protein), 16 domaines PKD (Ig-like) et un domaine REJ (receptor for egg jelly). Cette protéine compte également 7-11 domaines transmembranaires, 5 boucles intracellulaires et un domaine C-terminal intracellulaire. La polycystine-1 est exprimée dans plusieurs tissus dont le rein, le cerveau, le cœur, les os et les muscles (Peters J.M.D., 1999). Sa fonction physiologique n'est pas encore connue. La polycystine-1 serait impliquée dans la différenciation terminale et dans la polarité des cellules épithéliales de rein en se basant sur les observations chez la souris KO pour la polycystine-1 (Lu W. et al., 1997 et Bhunia A.K., 2002) et sur sa localisation dans le complexe E-cadhérine/caténine de la jonction adhérente (Huan Y. et al., 1999) ainsi que dans les desmosomes (Scheffers M.S. et al., 2000, Bukanov N.O. et al., 2002). L'adhésion cellule-cellule pourrait être un élément clé à la fonction

de la polycystine-1. La polycystine-1 semble aussi importante dans la signalisation. Le domaine cytoplasmique en C-terminal de la polycystine-1 est important dans la régulation de la prolifération et de la morphogénèse des cellules épithéliales de rein (Nickel et al., 2002; Roitback T. et al., 2004). L'activation de la voie Wnt par la stabilisation de la β -caténine et de l'activation des facteurs de transcription TCF/LEF a été prouvée (Kim E. et al., 1999). Le C-terminal de la polycystine-1 régulerait aussi la signalisation de protéine G par l'activation de la voie c-JNK (c-Jun N-terminal kinase) et de PKC- α (Parnell SC et al., 1998). Bhunia et al. en 2002 ont démontré que la polycystine-1 est également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT et p21^{cip1/wcf1}. Finalement, la polycystine-1 formerait un complexe avec la polycystine-2 afin de moduler le calcium (canal) (Ikeda M. et Guggino W.B., 2002). La mise en évidence de ce complexe a été faite par l'équipe du Dr. Ong avec des essais de co-immunoprécipitation et de co-localisation (Newby L.J. et al., 2002).

Figure 4. Le gène *pkd1*. A) Le gène *pkd1* (barre rouge sur le dessin) se situe le bras court du chromosome 16 (13.3). B) La représentation des introns et exons du gène *pkd1*. C) Tableau représentant certaines mutations du gène *PKD1*.

Chromosome 16

10 Mb

Telomere

p13.3

p13.2

p13.13

p13.12

p13.11

p12.3

p12.2

p12.1

TBA1

NKX2

SAZD

TSC2

PKD1

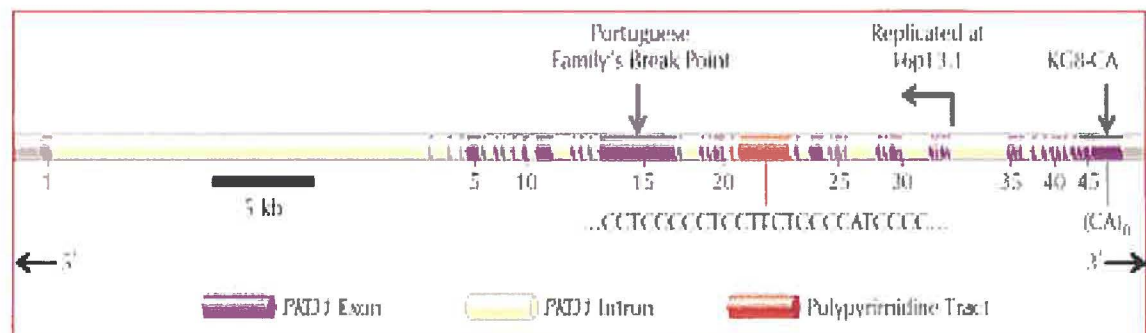
PRK1

PRK2

UMOD

PRKCB1

B

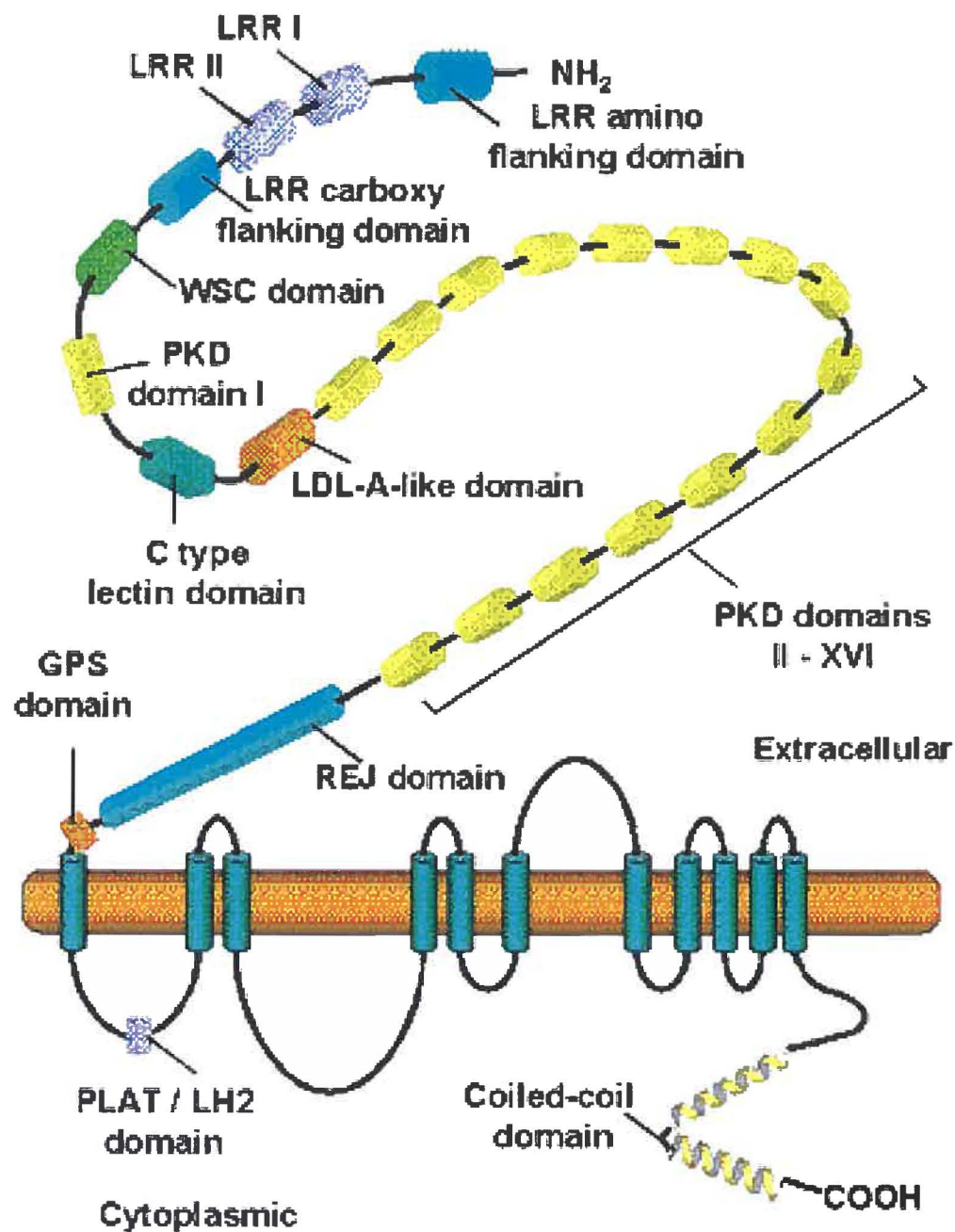


C

Mutation designation	Exon fragment	Amino acid ^a / DNA change	Pedigree	Segregation ^b demonstrated
PKDI				
285GC→A	1a	241	88	Yes
319insCC	1a	361	382	NP
C230X	5a	901C→A	381	NP
Q266X	5c	1007C→T	241	NP
R1340W	15c	4229C→T	366	NP
4804del252	15e	Δ1532-1615	375	NP
Q1636X	15f	5117C→T	433	Yes
5225delAG	15f	16711	206,376	Yes: NP
E1811K	15g	5642G→A	436	NP
O1828X	15h	5693C→A	293	Yes
W1837X	15h	5722G→A	379	NP
Y2092C	15l	6486A→G	352	Yes
6651del28	15m	21441	86	Yes
Q2158X	15m	6683C→T	438	Yes
R2163X	15m	6698C→T	449	Yes
S2164X	15m	6702C→G	293	Yes
I2260del	15n	6989del3	239	Yes
IVS16+1G→C	16	Δ2306-2355	450	Yes
Q2376X	17	7337C→T	602	NP
7596del10	18	24611	372	NP
8531delC	23a	27731	377	Yes
Y2991X	25	9184C→G	423	Yes
I3167F	27	9710A→T	439	NP
Q3473X	34	10628C→T	385	NP
I1192delC	37	36601	386	NP
Y3780X	40	11551C→G	174	Yes
IVS40+1G→A	41	Δ3804-3845	417	NP
L3851P	42	11763T→C	341	Yes
I2474delGG	45	40871	374	NP
I2521insA	45	41011	243	NP
I2617delC	45	41351	373	NP

13

Figure 5. Le produit du gène *pkd1* : la polycystine-1 . La polycystine-1 est une glycoprotéine membranaire de 4302 acides aminés possédant une masse moléculaire de 460 KDa. Dans sa région extracellulaire (N-terminal (NH₂), elle possède plusieurs domaines bien illustrés dans la figure : un domaine LRR, un domaine lectine, un domaine LDL-A, 16 domaines PKD (IG-like) et un domaine REJ (receptor for egg jelly). Elle contient aussi 5 boucles intracellulaires et 7-11 domaines transmembranaires. Son extrémité C-terminal (COOH) renferme un motif coiled-coil. À noter un domaine GPS (G-protein-coupled receptor proteolytic site), domaine possiblement important pour son clivage.



Sandford.R, 2000

2.4 Importance de la polycystine-1 au niveau du système rénal

2.4.1 Souris KO pour le gène *pkd1* (in vivo)

Les souris KO pour le gène *pkd1* se développent normalement jusqu'au jour embryonnaire (E14.5) (Lu W. et al., 1997 et Bhunia A.K., 2002). Après E14.5, la formation de kystes à partir de tubules de rein de ces souris KO est visualisée, et ce à une période où normalement les tubules s'élongent et mûrissent. Les souris meurent *in utero* suite à de multiples kystes au niveau du rein et du pancréas et de problèmes vasculaires (Joly D. et al., 2003; Lu et al., 1997; Kim K. et al., 2000). Au niveau cellulaire, les cellules de tubules rénaux n'atteignent pas le stade de différenciation terminale. L'implication de la polycystine-1 dans l'initiation de la différenciation terminale s'explique possiblement par sa présence au niveau des jonctions intercellulaires et des cascades qu'elle active.

2.4.2 Effet de la surexpression de la polycystine-1 dans les MDCK (*in vitro*)

Les cellules MDCK (Mardin-Darby canine kidney cells) peuvent former des tubules rénaux lorsque mises en culture dans un gel de collagène trois dimensions et traitées au HGF (Hepatocyte growth factor) (Montesano R. et

al. , 1991 et Boletta A. et al., 2000). Si la polycystine-1 est surexprimée dans les MDCK, cette dernière est suffisante à induire la formation de tubules rénaux dans un gel trois dimensions sans l'aide du HGF. Les cellules surexprimant la polycystine-1 ont un plus faible taux de prolifération et d'apoptose, contrairement aux cellules mutées pour le gène *PKD1* (Boletta A. et al., 2000). Lorsque les sous-clones surexprimant la polycystine-1 perdent l'expression de la polycystine-1, l'apparition d'un phénotype kystique est inévitable (Bhunja A.K. et al. 2002, Boletta A. et al., 2000). Ces résultats suggèrent que la polycystine-1 est capable d'induire la formation de tubules rénaux et qu'elle est impliquée dans la différenciation terminale.

2.4.3 Expression endogène de la polycystine-1 et sa localisation dans les cellules MDCK

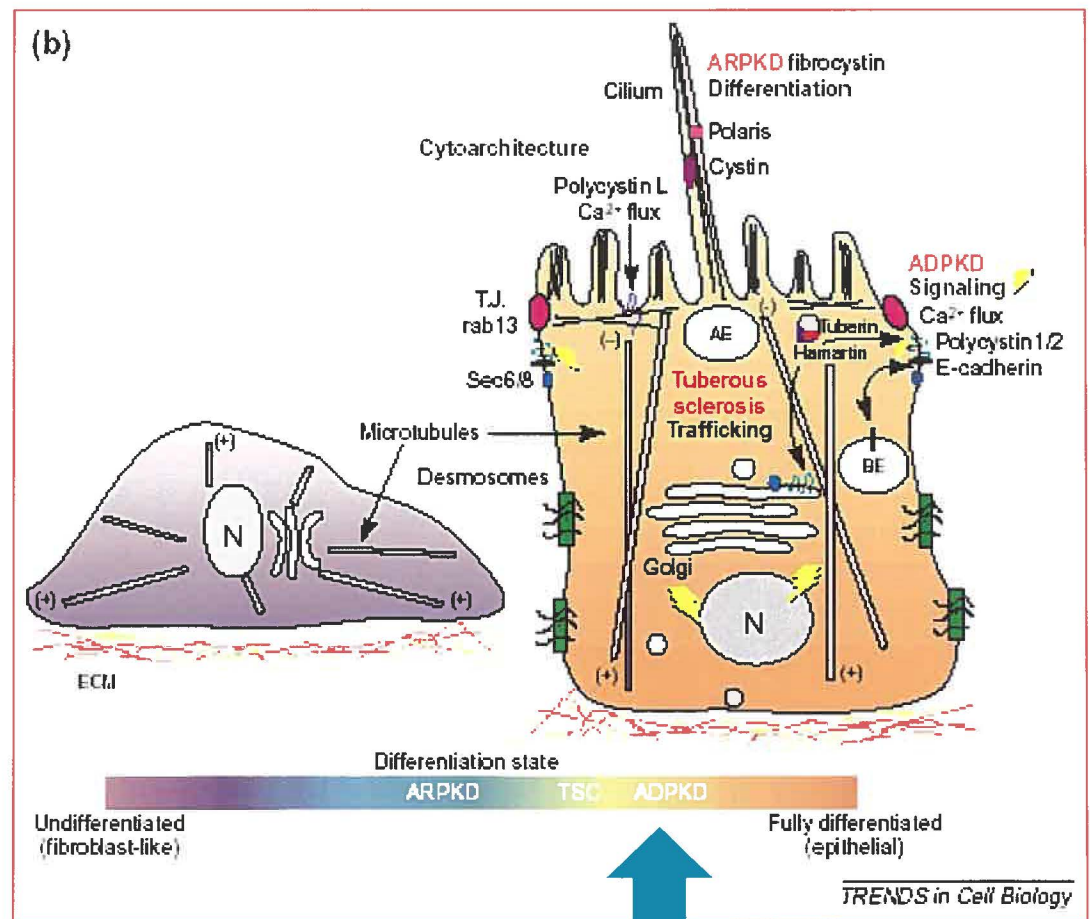
Des études suggèrent que la polycystine-1 doit être à la membrane des cellules épithéliales pour être fonctionnelle (Scheffers M.S, 2000 ; Roitback T., 2004 et Bukanov N.O. et al., 2002). Une perte de localisation au niveau de la membrane baso-latérale amène un phénotype kystique. La polycystine-1 est localisée au niveau des jonctions adhérentes (zonula adherens) et des desmosomes (macula adherens) dans les cellules épithéliales de rein (Scheffers M.S. et al., 2000, Bukanov N.O. et al., 2002 et Huan Y. et al., 1999) .

2.4.4 Implication de la polycystine-1 dans la polarité des cellules épithéliales de rein

La présence de la polycystine-1 au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes des cellules épithéliales de rein a été montrée (Scheffers M.S. et al., 2000, Bukanov N.O. et al., 2002 et Huan Y. et al., 1999). L'importance de la polycystine-1 dans la polarité des cellules épithéliales de rein est justifiable en se référant au phénotype d'une cellule ADPKD (mutation de la polycystine-1). La perte de polarité de ces cellules inclue des changements au niveau de la signalisation, de la différenciation et du transport vectoriel. Arnould T. et al. (1998) ont montré que les petites protéines G et que la PKC- α permettent l'activation de la voie JNK/AP-1 (facteur de transcription) par la polycystine-1. Son implication a également été démontrée au niveau de la voie de signalisation JAK/STAT (Bhunja A.K. et al., 2002) et Wnt (Kim E, et al., 1999). La régulation appropriée des voies de signalisation est nécessaire à un développement normal du rein. Des modifications au niveau de la polarité membranaire de la pompe Na⁺K⁺ATPase et du récepteur EGF ainsi que la séquestration de la E-cadhérine au niveau du compartiment intracellulaire sont observées suite au défaut primaire de la mutation de la polycystine-1 dans les cellules ADPKD (Du J. et Wilson P.D., 1995, Wilson P.D. et al., 1991; Charron A.J. et al., 2000, Roitbak T. et al., 2004). L'altération de la signalisation ou du

complexe de la polycystine-1 mène à un phénotype immature et à une dédifférenciation partielle (Stein M.P. et al., 2002) (figure 6).

Figure 6. Illustration de la dédifférenciation partielle et de la perte de la polarité dans les cellules ADPKD. Les différentes recherches ont prouvées que l'altération de la signalisation ou du complexe de polycystine-1 amène la cellule dans un phénotype immature et dédifférencié. La flèche représente le niveau de différenciation des cellules ADPKD sur une échelle totale de différenciation allant donc d'une cellule fibromateuse à une cellule épithéliale.



Stein M.P., et al., 2002

La polycystine-1 se localise aussi au niveau du cilium primaire dans le rein. Il pourrait être très intéressant d'étudier le cilium primaire au niveau de l'intestin pour savoir si la polycystine-1 s'y localise.

3. Le cilium primaire

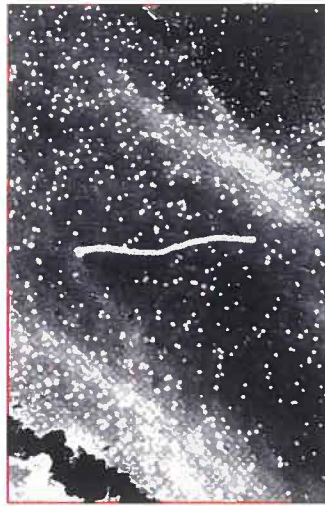
3.1 Caractéristiques générales

Le cilium primaire a été observé pour la première fois en 1898 par Zimmerman K.W. (1898). Quelques décennies plus tard, soit à la fin des années 90, un regain d'intérêt a été vu pour ce petit organite (figure 7A et 7B). On lui conféra le rôle d'antenne sensorielle pour les cellules (Roth K.E. et al., 1988; Schwartz E.A. et al., 1997; Praetorius HA et Spring K.R., 2001). Le cilium primaire est un cil non-motile (9+0) possédant 9 doublets de microtubules (Pazour G.J. et Rosenbaum J.L., 2002) (figure 7C). Sa membrane est la continuité de la membrane plasmique de la cellule. Ce petit organite varie d'une espèce à l'autre. On le retrouve, en général, à la surface apicale des cellules (Wheatley D.N., 2000). Certains cilia ont été localisés, cependant, à la membrane basale et en-dessous de la membrane plasmique. La taille du cilium peut varier de 2 μm à 30 μm dans le rein (Joly D. et al., 2003) et se retrouve chez la plupart des cellules de vertébrés. L'intestin est une exception à la règle (Wheatley D.N. et al., 1996). En fait, la seule évidence provient, 25 ans plus tôt, de l'analyse

d'une crypte intestinale d'un fœtus de 9 semaines (Moxey C.P. et Trier J.S., 1978). Aucun cilium n'a été vu sur des modèles cellulaires intestinaux. Une excellente compilation des cellules possédant un cilium primaire est réalisée depuis 2000(www.members.global2000.net/~browser/cilialist.html). La fonction physiologique est inconnue, mais plusieurs résultats montrent que le cilium primaire agirait en tant que senseur de flux, de mécanorécepteur (Nauli S.M. et al., 2003, Praetorius H.A. et Spring K.R., 2001 et Praetorius H.A. et Spring K.R., 2002).

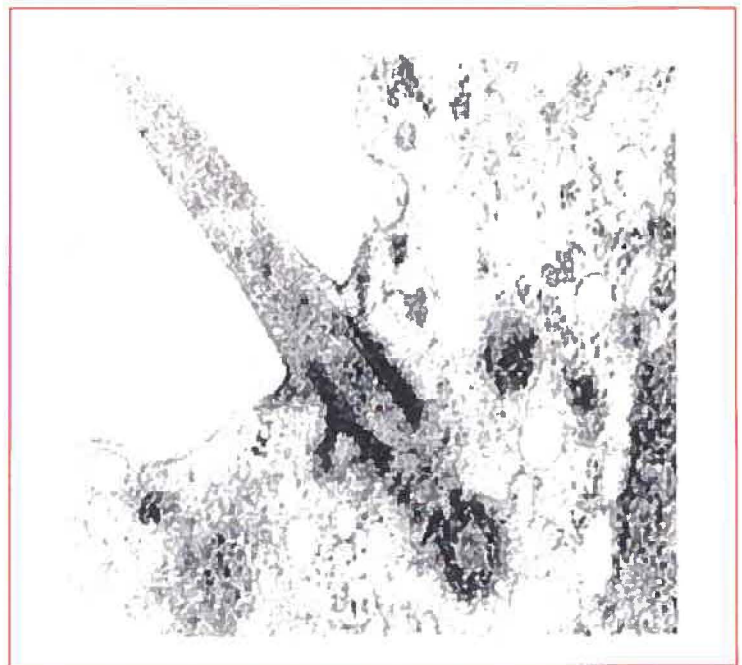
Figure 7. La structure du cilium primaire. A) Image à 7500 X en microscopie à balayage (SEM) d'un long cilium primaire à la surface d'une cellule épithéliale de tubule proximal de rein. B) Image en microscopie électronique à balayage d'un cilium primaire sur une cellule de la zona glomerulosa de rat. C) Architecture microtubulaire observée dans un cilium motile (9+2) (1) et dans la majorité de cilia primaire non-motile (9+0) (2).

A



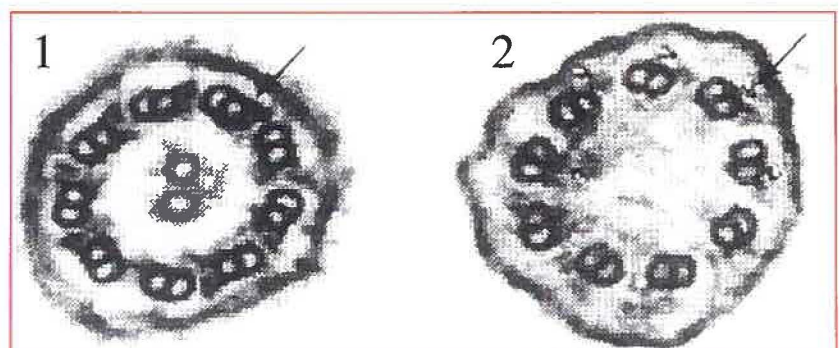
Wheatley D.N. et al., 1996

B



Ong A.C. et Wheatley D.N., 2003

C



Pazour G.J. et Rosenbaum J.L., 2002

4. Hypothèse et objectifs

Étant donné son implication dans le développement et le maintien de la cytoarchitecture des cellules épithéliales de rein, nous avons émis l'hypothèse que la polycystine-1 est impliquée dans l'acquisition et le maintien du phénotype polarisé et différencié des cellules épithéliales intestinales humaines.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, l'objectif général de la présente étude était d'identifier et de caractériser la polycystine-1 au niveau de l'épithélium intestinal humain. Nos objectifs spécifiques étaient de :

- 1) Déterminer l'expression et la localisation de la polycystine-1 dans l'épithélium intestinal humain *in vivo* et dans les modèles cellulaires qui récapitulent l'axe crypte-villosité.
- 2) Vérifier l'expression de la polycystine-1 selon l'état de polarité des cellules épithéliales intestinales.
- 3) Déterminer la présence et la fonctionnalité du cilium primaire au niveau de l'épithélium intestinal humain.
- 4) Déterminer la localisation de la polycystine-1 au niveau du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain.

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Tissus humains

Les spécimens d'intestin grêle de fœtus humains de 13 à 20 semaines de gestation (post-fertilisation) obtenus par avortement thérapeutique et d'adultes obtenus par le don d'organe ont été utilisés dans notre étude. Les spécimens sains acquis seulement dans de courts délais (moins de 1 heure) ont été employés. Ce projet a été fait en conformité avec les protocoles d'éthique approuvés.

2. Culture cellulaire

Dans nos études, deux lignées épithéliales intestinales humaines ont été utilisées.

2.1. Les cellules Caco-2/15

La lignée cellulaire de carcinome de colon humain Caco-2/15 est un clone (Beaulieu J.F. et Quaroni A, 1991) provenant de la lignée parentale de Caco-2 (HTB37; American Type Culture Collection, Rockville, MD; Fogh J., 1977). À confluence, ces cellules entament spontanément un processus de

différenciation entérocytaire observé *in vivo* dans l'intestin humain. Ce processus mènera à l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, ON.) contenant 10% (v/v) FBS CELlect Gold (ICN Biomedicals INC., Aurora, OH), 4 mM de glutamine (Gibco BRL) et 20 mM HEPES (Gibco BRL), à 37° C dans une atmosphère humide composée de 95% d'air et 5% de CO₂. Les changements de milieu étaient effectués aux 48 heures.

2.2 Les cellules HIEC-6

Les cellules HIEC-6 ont été générées d'un intestin foetal humain normal (Perreault N. et Beaulieu J.F., 1996). Ces cellules sont prolifératives et n'expriment aucun marqueur de différenciation des cellules de la villosité. Les cellules ont été cultivées dans du milieu Opti-Mem 1 (Gibco BRL, Rockville, MD) contenant 4% (v/v) de sérum de veau foetal (FBS CELL Gold) (ICN Biomedicals Inc.), 2 mM de glutamine (Gibco BRL), 10 mM HEPES (Gibco BRL) et 5 ng/ml d'EGFh (BD Biosciences, Bedford, MA), à 37° C sous une atmosphère humide composée de 95% d'air et 5% de CO₂. Les changements de milieu étaient effectués aux 48 heures.

3. Immunofluorescence indirecte

3.1 Tissus humains

Les cryosections de 3 μm de tissus humains ont été obtenues à l'aide d'un cryostat Leica CM3050 (Meyer Instruments, Inc., Houston). Les sections ont, par la suite, été déposées sur une lame de verre silanisée, séchées à l'air ambiante pendant 1 heure et placées à -80°C jusqu'à utilisation. Les sections ont été fixées pendant 10 minutes à -20°C dans le méthanol 100%, lavées au PBS (phosphate-buffered saline) et bloquées pendant 30 minutes dans du PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé. Les lames ont ensuite été incubées 1 heure avec différentes préparations d'anticorps primaire dans du PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé (tableau 1). Après 3 lavages au PBS, les lames ont été incubées avec l'anticorps secondaire 1 :25 dans du PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé (tableau 1). Les noyaux ont été colorés avec une solution de DAPI diluée 1 :5000 pendant 2 minutes. Après 3 lavages au PBS, les lames ont été montées à l'aide d'une solution de glycérol-PBS (9 :1) contenant 0.1% de paraphénylènediamine et observées à l'aide d'un microscope leica DM-Rxa (Leica) équipé pour la fluorescence.

3.2 Cellules

Les cellules ont été ensemencées sur des lames multichamps, Lab-teck (Nalge Nunc International, Napierville, IL), jusqu'à l'atteinte de la confluence désirée. Les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS froid et fixées au méthanol 100% pendant 10 minutes à -20°C. Les cellules traitées ont été solubilisées à l'aide d'une solution froide de lyse/stabilisation du cytosquelette (contenant 1% de Triton X-100, 50 mM NaCl, 10 mM PIPES pH 6,8, 300 mM de sucrose et 3 mM $MgCl_2$) avant la fixation de 30 minutes. Les cellules ont été par la suite incubées à température pièce dans une solution de PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé et 1 heure dans une solution contenant chacun un anticorps primaire du tableau 1 dans une solution de PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé. Les cellules ont été incubées en présence d'un anticorps secondaire du tableau 1, 1/25 dans du PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé, pendant 1 heure après 3 lavages préalables de 5 minutes au PBS. Des contrôles négatifs (sans anticorps primaire) ont été effectués pour chaque expérimentation. Les cellules rincées au PBS ont été colorées dans une solution de DAPI diluée 1/5000 pour 2 minutes. Après 3 lavages au PBS, les lames ont été montées à l'aide d'une solution de glycérol-PBS(9 :1) contenant 0.1% de paraphénylènediamine et observées à l'aide d'un microscope leica DM-Rxa (Leica) équipé pour la fluorescence.

Tableau 1 : Anticorps utilisés pour les immunofluorescence indirectes.

Anticorps primaire					
Anticorps	Type Espèce	Protéine reconnue	Fixation	Dilution	Source
Anti-PC-1	Polyclonal Lapin	Polycystine-1	Méthanol	1/250	Richard Sandford Cambridge, UK
Anti-E-Cadherin	Monoclonal Souris	E-cadhérine	Méthanol	1/250	Transduction Labotaries Mississauga, ON
Anti-E-Cadherin	Polyclonal Lapin	E-cadhérine	Méthanol	1/250	Santa Cruz Biotech Santa Cruz, CA
ZK-31	Monoclonal Souris	Épitope Desmosomal	Méthanol	1/100	Sigma-Aldrich Oakville, ON
Anti-acetylated tubulin	Monoclonal Souris	Tubuline- α acétylée	Méthanol	1 /1000	Sigma-Aldrich Oakville, ON
Anticorps secondaire (1/25)					
Anticorps	Type reconnu	Méthode de révélation		Source	
Anti-Rabbit-Rhodamine	IgG Lapin	Rhodamine		Chemicon Int Temucula, CA	
Anti-Rabbit-FITC	IgG Lapin	FITC		Chemicon Int Temucula, CA	
Anti-Mouse FITC	IgG souris	FITC		Chemicon Int Temucula, CA	
Anti-Mouse Rhodamine	IgG souris	Rhodamine		Chemicon Int Temucula, CA	

4. Immunobuvardage de type western

4.1 Solubilisation des protéines cellulaires

4.1.1. *Tampon de solubilisation Laemmli*

Les cellules contenues dans chaque pétri ont été préalablement lavées à deux reprises avec du PBS. Deux cents cinquante ul pour les cellules HIEC et 500 ul pour les cellules Caco-2/15 de tampon de solubilisation Laemmli (tampon tris-HCl 0,125M pH 6,8, 0,23% de glycérol, 0,001% de bleu de bromophénol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) contenant 5% de β -mercaptoéthanol (Bio-Rad) ont été ajoutés dans chaque pétri de 100 mm. Les échantillons ont été récupérés dans le tampon de solubilisation, soniqués (Ultrasonic processor; Mandel Scientific, St-Laurent, QC) à trois reprises pendant 5 secondes puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation de 10 minutes à T° pièce à 13 000 rpm. Les lysats cellulaires ont été conservés à -20°C.

4.1.2. *Tampon de solubilisation de lyse/stabilisation du cytosquelette* (Isolation de la fraction soluble et insoluble)

Les cellules contenues dans chaque pétri 100 mm ont été lavées à deux reprises avec du PBS. Deux cents ul de tampon de solubilisation de

lyse/stabilisation du cytosquelette (1% de Triton X-100, 50 mM NaCl, 10 mM PIPES pH 6,8, 300 mM de sucrose et 3 mM MgCl₂) ont été ajoutés dans chaque pètri de 100 mm. Les échantillons ont été récupérés dans le tampon de solubilisation de lyse/stabilisation du cytosquelette et laissés sur la glace pour 30 minutes. Le surnageant (partie soluble) a été récupéré après 20 minutes de centrifugation à 13 000 rpm à 4°C, et conservé à -20°C. Le culot (partie insoluble) a été solubilisé à l'aide de 200 µl du tampon Laemmli et récupéré suivant la procédure décrite en 4.1.1.

4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Suite au dosage de protéines selon la méthode modifiée de Lowry (Peterson G.L., 1977), 100 µg ont été utilisés pour les échantillons préparés à partir du tampon de solubilisation Laemmli et 20% du volume des échantillons préparées à partir du tampon de solubilisation de lyse/stabilisation du cytosquelette. Les protéines ont été séparées sur un gel séparateur 8% (acrylamide/bisacrylamide 30 : 0,15 (Bio-Rad), 0,75 M de Tris HCl pH8,8 et 1% de SDS) de type Thomas-Kornberg (Thomas et Kornberg, 1975). Les gels concentrateurs contenaient 4% d'acrylamide/bisacrylamide 29 : 1, 0,25M tris-HCl pH6,8 et 1% SDS. L'électrophorèse se déroulait à 70V dans un tampon composé de 0,61% Tris-HCl, 0,1% de SDS et 2,88% de glycine dans l'eau bidistillée pendant 16 heures. Une fois la migration complétée, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad), pré-incubée 10

minutes dans le tampon de transfert (1,4% de glycine et 0,3% de Tris en solution dans l'eau bidistillée) dans un appareil Bio-Rad pendant 30 minutes à 20 volts, puis 90 minutes à 100 volts. L'efficacité du transfert a été vérifiée par la coloration au rouge de Ponceau 0,2% (Sigma-Aldrich). Les membranes ont été décolorées 10 minutes avec du PBS sous agitation.

4.3 Immunodétection des protéines

Les membranes ont été saturées en protéines (blocage) pendant une heure dans une solution contenant 10% de lait écrémé en poudre. Elles ont été ensuite incubées avec l'anticorps primaire dans du PBS contenant 5 % de lait en poudre écrémé pour une période de 16 heures à 4°C. Les membranes ont été lavées à trois reprises avec du PBS contenant 0,2% de Tween 20 (Bio-Rad) et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase 1/5000 dans une solution de PBS contenant 5 % de lait en poudre écrémé pour 60 minutes à température de la pièce. Les membranes ont été lavées de nouveau avec du PBS/Tween 20 0,2% et du PBS à trois reprises chacune. Les bandes immunoréactives ont finalement été révélées avec le système ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Life Science, Piscataway, NJ).

Tableau 2 : Anticorps utilisés pour les immunobuvardages (Western blot).

Anticorps primaire				
Anticorps	Type Espèce	Protéine reconnue	Dilution	Source
Anti-POLYCYSTINE-1 Richard Sandford Cambridge, UK		Polyclonal Lapin	Polycystine-1	1/2000
Anticorps secondaire (1/25)				
Anticorps	Type reconnu		Méthode de révélation	Source
Anti-Rabbit-HRP	IgG Lapin		Chemiluminescence	Amersham Pharmacia Biotech.

5. RT-PCR

L'ARN total des cellules HIEC et Caco-2/15 a été préparé avec du triPUR (Roche). La réaction a été réalisée avec 2 µg d'ARN total, 0,5 µg d'oligo- (dt) 12-18 primer (Qiagen) et la transcriptase inverse Omniscript (Qiagen). L'amorce sens 5' acggctttgcactcttcct 3' et l'amorce antisens 5'gtggtcgctaatactgctgctgcaa 3' spécifique pour la polycytine-1 humaine ont été utilisées. Le simple brin ADN a été amplifié dans du tampon à PCR (Quiagen) contenant 0,20 µM des deux amorces, 200 µM de dNTPs et 2,5 U de TAQ (Qiagen) pour 35 cycles de dénaturation (1 minute à 94°C) et d'alignement (1 minutes à 57°C) dans un « thermal cycler » (Perkin-Elmer DNA thermal Cycle model 480).

6. Microscopie électronique

Les tissus humains ont été rincés à deux reprises avec du PBS et 5% de saccharose et infiltrés avec une solution de saccharose 2,3 M pour 60 minutes à température de la pièce. Les tissus ont par la suite été rapidement congelés dans l'azote liquide. Des sections de 75 nm ont été préparées à l'aide un ultramicrotome III (LKB Bromma, Suède), rincées deux fois avec du PBS et bloquées pendant 30 minutes avec du PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé 10% à température de la pièce. Les sections ont été par la suite incubées pendant une période de 16 heures avec l'anticorps primaire 1 /25 (contenu dans du PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé) à 4°C et 1 heure avec la protéine A 10 nm (Sigma-Aldrich) à température de la pièce dans

du PBS contenant 10 % de lait en poudre écrémé . Finalement, les sections ont été colorées à l'acétate d'uracyl et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H-7500 (Hitachi High-technologies Canada, Canada).

7. Microscopie à balayage

Les cellules ont été lavées pendant 5 minutes à deux reprises avec du tampon Cacodylate de sodium (caco) 0,1M pH7,4. Les cellules ont alors été fixées pour 2 heures avec du glutaraldéhyde 2.5% dans un tampon caco 0,1M pH 7,4, lavées 5 minutes à deux reprises avec du tampon caco 0,1M pH7,4 et post-fixées une heure dans le tampon caco 0,1M pH 7,4 contenant 1% de tétroxyde d'osmium. Les cellules ont été placées dans de l'eau bidistillée pour la nuit. Une étape de déshydratation des lamelles a suivi. Les cellules ont été placées subséquemment pour une durée de 5 minutes dans de l'éthanol 30%, 40%, 50%, 70%, 85%, 95%, 3X 100%. Les spécimens ont été séchés dans une cloche au sec pour éviter qu'ils ne réabsorbent l'humidité. Les cellules ont été montées avec des autocollants conducteurs au carbone (TED Pella Inc., CA), métallisées avec de l'or palladium (5-15 nm) (Hummer 6; Anatech Ltd., Springfield, Va) et observé au détecteur d'électrons secondaire à l'aide d'un microscopie électronique à balayage JSM 840 (JEOL (USA) Inc., MA).

8. Perfusion

Les cellules ont été rincées à cinq reprises avec le milieu extracellulaire (140 mM NaCl, 1,2 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 15 mM HEPES et 10 mM de glucose; à pH 7,3) et incubées avec 500 µl de milieu extracellulaire contenant du Fluo-4 AM 10 µM à l'abri de la lumière pour 20 minutes à 37°C. Une fois le Fluo-4 AM enlevé, les cellules ont été de nouveau rincées à cinq reprises avec du milieu extracellulaire et incubée avec 1 ml de ce milieu à l'abri de la lumière pendant une période de 30 minutes à 37°C afin de permettre la désestérification. Les cellules ont été de nouveau rincées avec du milieu extracellulaire (5x) et placées dans la chambre de perfusion sur un microscope inversé à fluorescence. Le flux de la perfusion passe sur les cellules à environ 1.7 µl sec⁻¹ et à 8.5 µl sec⁻¹ et la réponse cellulaire à ce flux est visionné à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence.

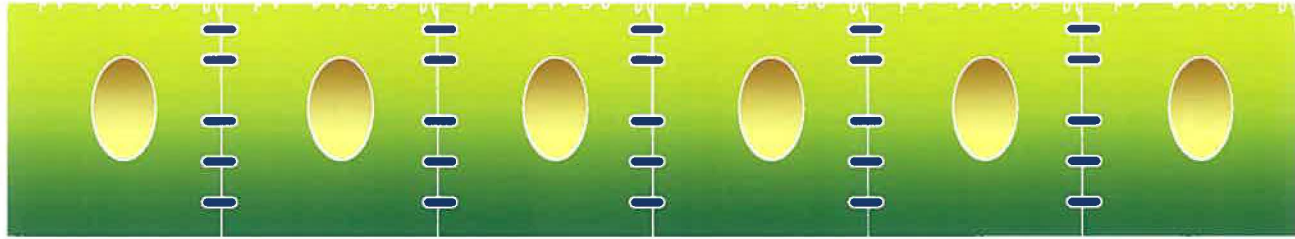
9. Inhibition et restauration des jonctions cellulaires (figure 8)

Les cellules Caco-2/15 post confluentes de deux jours ont été privées en sérum 16 heures dans un milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL) contenant uniquement de la glutamine 4 mM (Gibco BRL) et de l'HEPES 20 mM (Gibco BRL). Les cellules ont par la suite été traitées avec de l'EGTA 4 mM pour 30 minutes à 37°C. Ce traitement permet de rompre des jonctions cellulaires. Le remplacement du milieu des cellules avec du milieu frais contenant 1,8 mM de CaCl₂ pour 30 minutes a permis de restaurer les

différentes jonctions (Laprise P. et al., 2002; Pece S. et al.,1999; Voltberg T.,1986). Les cellules ayant subi le traitement étaient alors manipulées tel que décrit à la section 3.2 pour l'immunofluorescence indirecte.

Figure 8. Représentation schématique du traitement à l'EGTA 4 mM et au CaCl_2 1.8 M des cellules intestinales HIEC et Caco-2/15 pour l'inhibition et la restauration des jonctions intercellulaires. Lorsque les cellules sont traitées avec de l'EGTA 4 mM, les jonctions intercellulaires, calcium dépendante, sont défaites. La réintroduction de la concentration calcique adéquate dans le milieu des cellules par du CaCl_2 permet la réorganisation des ces différentes jonctions intercellulaires.

« Calcium switch »



EGTA 4 mM



CaCl₂ 1.8 mM



III- RÉSULTATS

1. Expression de la polycystine-1 dans l'épithélium intestinal humain.

Afin d'identifier la présence de la polycystine-1 dans l'épithélium intestinal humain, un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1 a été utilisé. Les premières études, *in vivo*, ont été effectuées par immunofluorescence indirecte sur plusieurs tissus intestinaux fœtaux humains de 13 à 20 semaines de gestation ainsi que sur des tissus adultes humains. En se référant à la figure 9 (A, B, C et D), il est possible de voir que la polycystine-1 est exprimée dans l'ensemble des tissus, tant fœtaux qu'adultes. L'expression de la polycystine-1 se localise au niveau du contact cellule-cellule des cellules épithéliales tout au long de l'axe crypte-villosité et ne varie pas selon le développement. Au niveau du mésenchyme, aucun marquage spécifique avec l'anticorps contre la polycystine-1 est discerné. Deux modèles cellulaires intestinaux, les cellules HIEC et Caco-2/15, ont été utilisés afin de représenter l'axe crypte-villosité (figure 10). Les cellules HIEC représentent les cellules prolifératives, non différenciées, de la crypte de l'intestin humain (Perreault N. et Beaulieu J.F., 1996). Les cellules Caco-2/15 sont pour leur part un excellent modèle pour étudier la différenciation entérocytaire. Ce sont des cellules prolifératives qui à l'atteinte de la confluence se différencient. Après plusieurs jours de confluence ces cellules possèdent un degré de différenciation

entérocytaire équivalent aux entérocytes de l'intestin humain *in vivo* (Vachon P.H. et al., 1996). Des études d'immunofluorescence indirecte ont également été réalisées dans ces modèles cellulaires. La localisation au contact cellules-cellules de la polycystine-1 est observée pour les cellules Caco-2/15 (figure 11C) tandis qu'elle se localise plutôt au niveau intracellulaire dans les cellules HIEC (figure 11D). Les noyaux des cellules ont été marqués à la coloration au DAPI (points bleus de la figure 11 A et 11B).

L'expression du gène *PKD1* a été confirmée par l'obtention d'un produit à 400 pb représentant une portion du mRNA de la polycystine-1 par analyse RT-PCR dans les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15 (figure 15A). Comme l'ARNm de la polycystine-1 est exprimé dans les modèles cellulaires, nous avons également vérifié le niveau d'expression protéique.

Par immunobuvardage de type Western (Western blot), l'expression de la polycystine-1 est aussi révélée (figure 12B). La taille des bandes détectée varie cependant entre les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15 différenciées. La masse moléculaire de la polycystine-1 est de 480 KDa (International Kidney Disease Consortium, 1995). Un volume égal de protéines à été utilisé pour chaque puits (100 ug). L'obtention de la bande de la polycystine-1 par immunobuvardage dans des lysats cellulaires totaux n'est pas toujours évidente pour certains types cellulaires. La faible expression et/ou la difficulté à effectuer l'électrophorèse de cette large protéine de 480 kDa compliquent les

expérimentations (Huan Y. et Adelsberg J.V., 1999). Une bande d'environ 480 kDa est observable uniquement dans l'extrait protéique du lysat total des cellules HIEC (figure 12B, 1). Dans les cellules Caco-2/15, deux bandes d'environ 250 kDa sont retrouvées (figure 12B, 2). Cela pourrait bien être associé à son clivage au site GPS de son extrémité N-terminale et à d'autres sites de clivage inconnus de la protéine dans l'intestin humain (Qian F. et al., 2002). Le site GPS est le site de clivage de d'autres protéines également (Krasnoperov V.G. et al., 1997). L'ensemble des différents résultats de notre caractérisation a permis premièrement d'observer que la polycystine-1 est exprimée tout le long de l'axe crypte-villosité de l'épithélium intestinal humain tant *in vivo* qu'*in vitro* et ce peu importe le stade de développement.

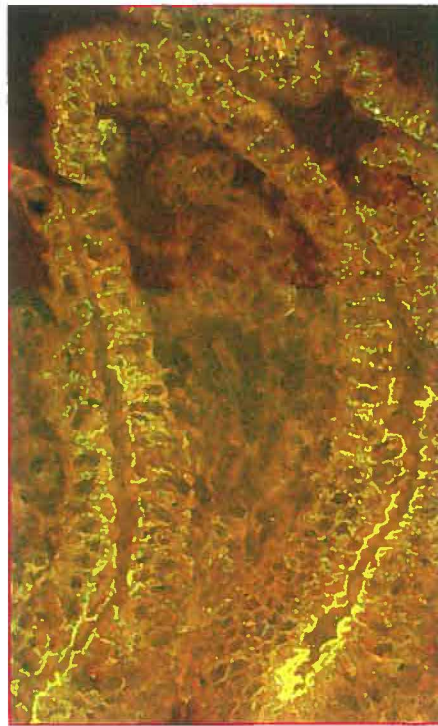
Figure 9. Immunodétection de la polycystine-1 (PC-1) dans l'intestin fœtal et adulte humain. Immunofluorescence indirecte de cryosections d'intestin fœtal de 13 semaines de gestation (a) 15 semaines de gestation (b) 19 semaines de gestation (c) et d'intestin adulte (d) avec l'anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1. Le marquage de la PC-1 se localise au niveau du contact cellule-cellule tout le long de l'axe crypte-villosité et ce peu importe le stade de développement de l'intestin humain.

A



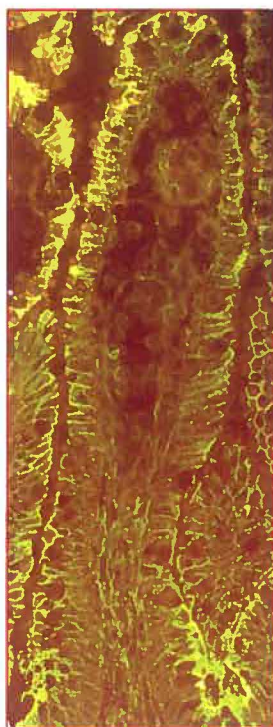
13 semaines

B



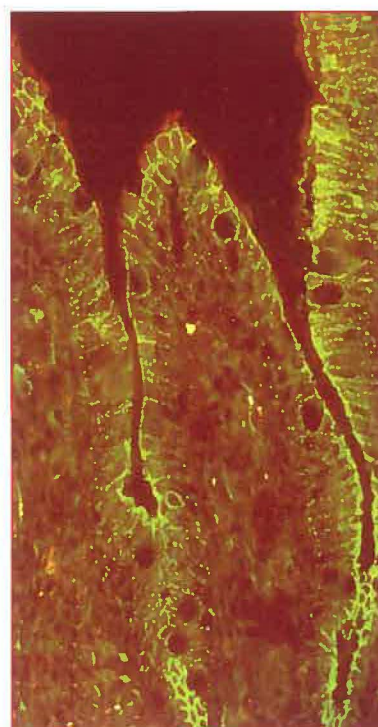
15 semaines

C



19 semaines

D



Adulte

Figure 10. Modèles cellulaires utilisés dans notre étude récapitulant l'axe crypte-villosité d'un intestin grêle humain. La lignée cellulaire HIEC représentant les cellules de la crypte et les Caco-2/15 représentant les cellules de la villosité. Les cellules Caco-2/15 sont un modèle cellulaire utilisé pour étudier la différenciation cellulaire tandis que les HIEC sont utilisées pour étudier la prolifération.

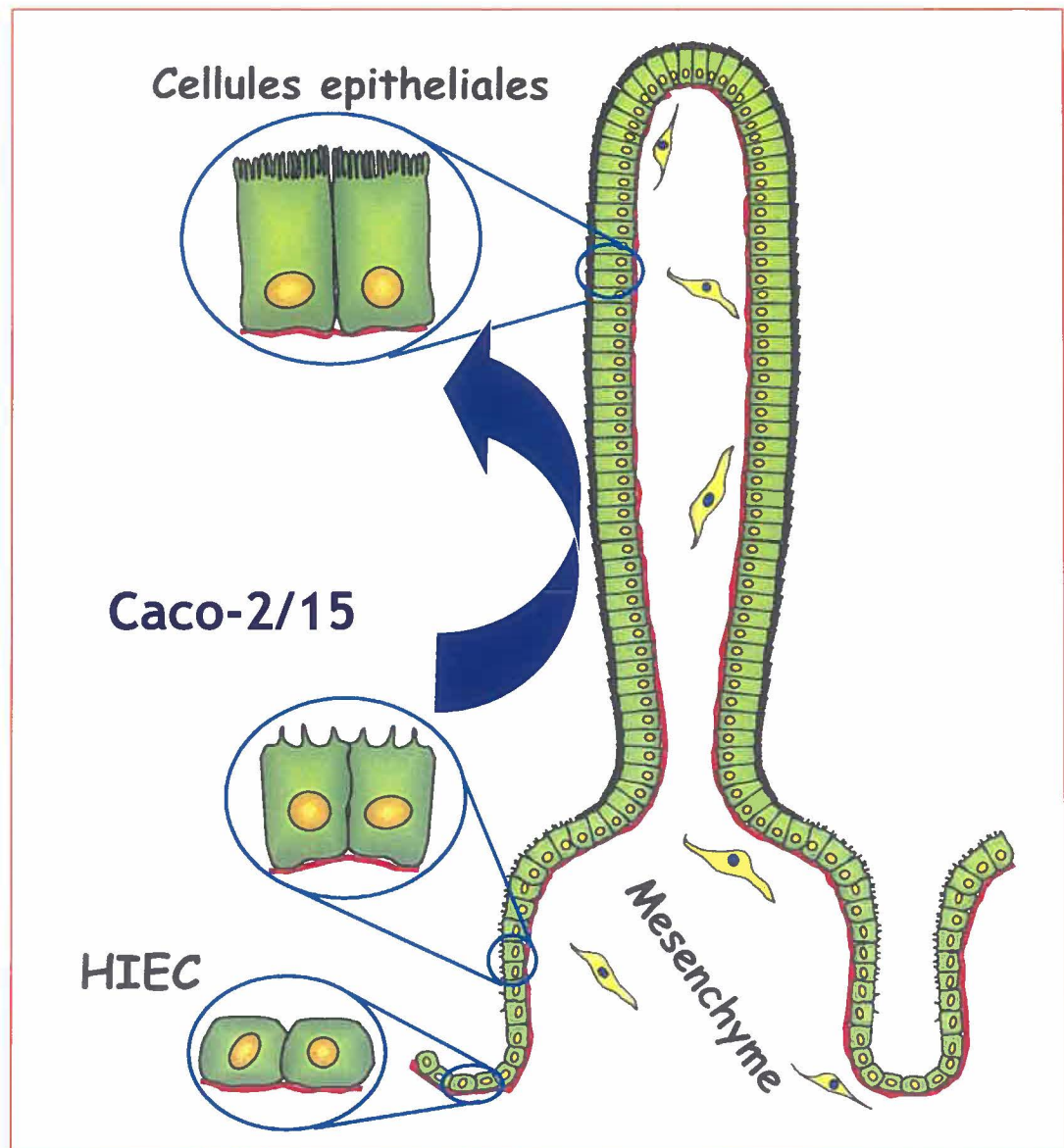
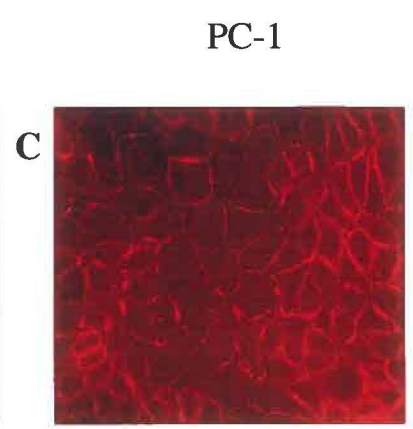
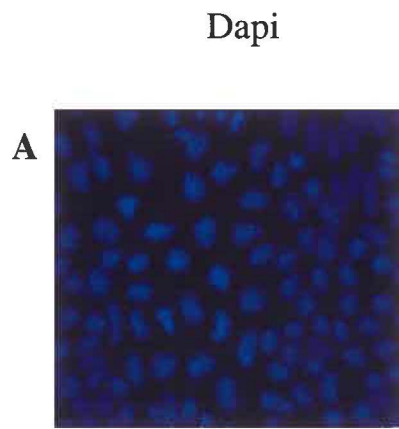


Figure 11. Immunodétection de la polycystine-1 (PC-1) dans les modèles cellulaires intestinaux, HIEC et Caco-2/15, par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1. Les cellules HIEC ont été cultivées dans un milieu optimem supplémenté de 4% en sérum (FBS) tandis que les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum (FBS) jusqu'à confluence. Les cellules ont alors été fixées et soumises à une immunodétection pour l'antigène de la PC-1. Dans les caco-2/15, le marquage de la polycystine-1 est localisé au contact cellule-cellule. Dans les cellules HIEC, l'antigène de la PC-1 se retrouve au niveau intracellulaire.

Caco 2/15 +5
(confluente)



HIEC (confluente)

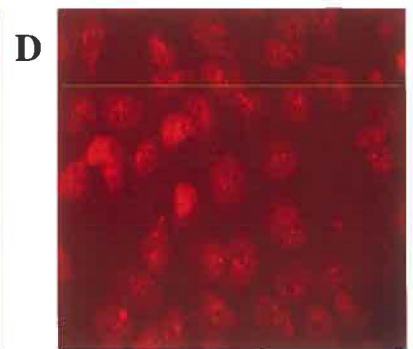
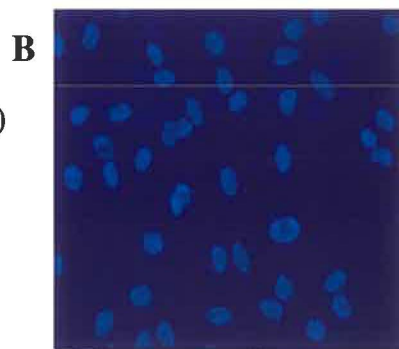
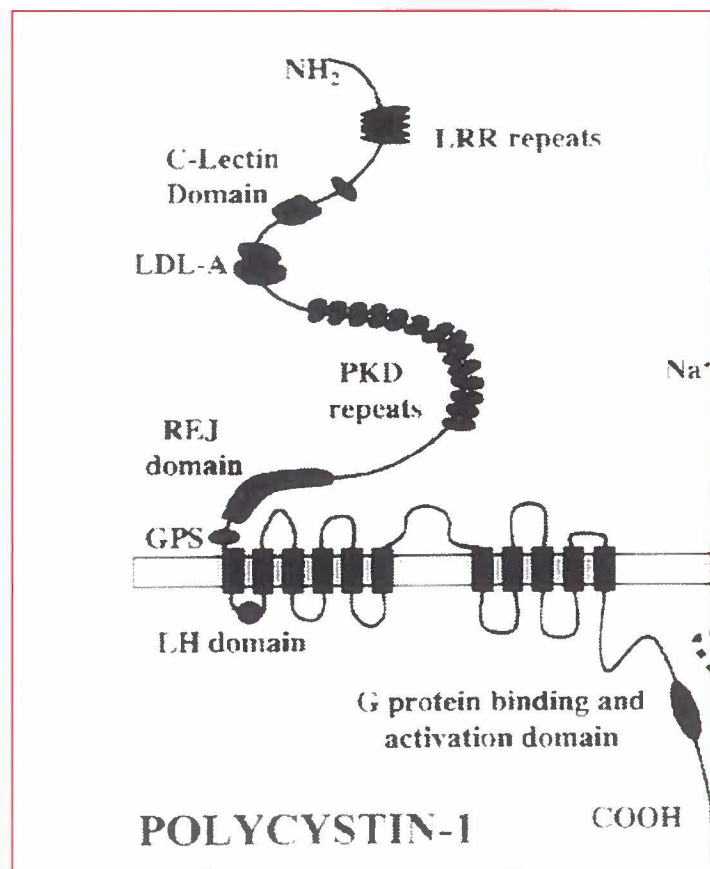
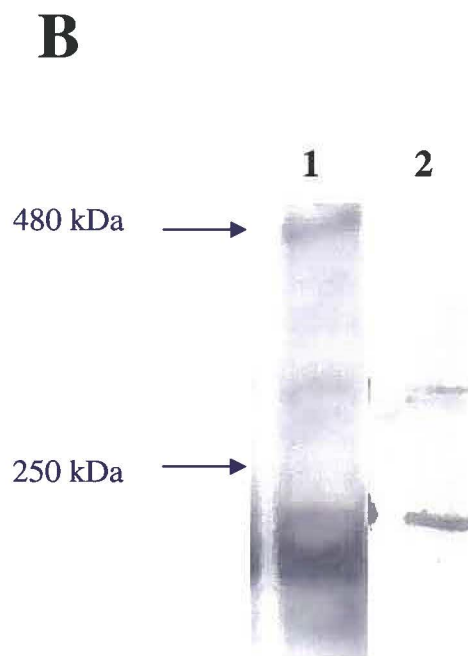
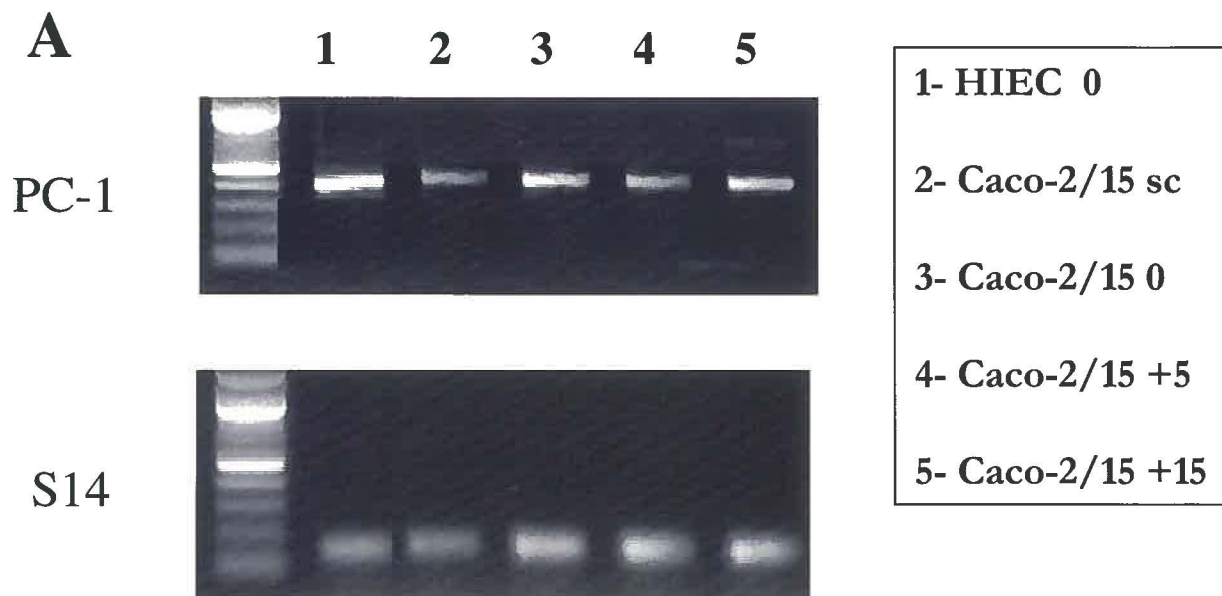


Figure 12. Étude non-quantitative de l'expression de l'ARNm et de la protéine PC-1. Les cellules HIEC ont été cultivées dans un milieu optimem supplémenté de 4% en sérum (FBS) tandis que les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum (FBS). A) RT-PCR sur les HIEC 0 et Caco-2/15 à différents jours de confluence (sc, 0, +5, +15). La PC-1 est exprimée dans les modèles intestinaux, HIEC et Caco-2/15. B) Immunobuvardage de type Western de la polycystine-1 dans les lignées cellulaires intestinales HIEC (1) et Caco-2/15 (2). 100 µg de lysat cellulaire de HIEC et Caco-2/15 ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 8%, transférés sur une membrane de nitrocellulose et soumis à un immunobuvardage avec un anticorps reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1. Une bande à 480 kDa est retrouvée uniquement dans les cellules HIEC tandis que deux bandes aux alentours de 250 kDa sont observées dans les caco-2/15.



Quian F. et al., 2002

2. La localisation de la polycystine-1 dans les jonctions adhérentes et les desmosomes

2.1 La co-localisation de la polycystine-1 avec des protéines de jonction

La polycystine-1 se retrouve au niveau de l'épithélium intestinal humain. Cette expression dans les tissus intestinaux humains et dans les cellules Caco-2/15 semble se localiser au niveau du contact cellule-cellule. Pour étudier plus précisément la localisation de la polycystine-1 dans la membrane plasmique, des études de co-localisation avec des molécules de jonction ont été effectuées. L'anticorps polyclonal contre la polycystine-1 a été utilisé de pair avec des anticorps monoclonaux anti-E-cadhérine, protéine associée à la zonula adherens, et Zk-31, un antigène desmosomal. Une étude d'immunofluorescence indirecte a été effectuée sur des tissus intestinaux humains au niveau des jonctions serrées, avec un anticorps anti-occludine, mais aucune co-localisation n'a été observée. Ceci corrèle avec ce qui a déjà été vu dans la littérature pour le système rénal et qui montre que la polycystine-1 et la ZO-1 (un autre marqueur des jonctions serrées) par étude d'immunofluorescence indirecte, ne co-localisent pas (Sheffers M.S. et al., 2000; Bukanov N.O. et al., 2002). Des études en microscopie confocale sur le rein illustrent que les protéines sont distribuées à différents niveaux de la membrane plasmique (Sheffers M.S. et al., 2000).

Analysée, sur différents tissus intestinaux humains fœtaux (13 à 20 semaines de gestation) et adultes, par étude de double marquage en immunofluorescence indirecte, la polycystine-1 (marquage en vert de la figure 13A et 13B) co-localise partiellement avec la E-cadhérine (marquage en rouge de la figure 13C et 13D) dans les jonctions adhérentes. Le marquage en jaune, signe de co-localisation, de la figure 13E et 13F illustre bien ces différentes régions. Aucune différence au niveau du double marquage avec la polycystine-1 et la E-cadhérine n'est observable entre le stade fœtal et adulte, le niveau de co-localisation est le même. Le marquage de la ZK-31 (figure 14C et 14D), par immunofluorescence indirecte, présente toutefois une très grande similarité avec le marquage de la polycystine-1 (figure 14A et 14B) dans les tissus fœtaux et adultes : un marquage jaune ponctuel aux jonctions intercellulaires de la membrane plasmique latérale (figure 14E et 14F)). *In vitro*, les différentes études de co-localisation avec les molécules de jonction confirment ce qui avait été vu précédemment dans les tissus intestinaux humains (figure 15 et 16). Dans les cellules Caco-2/15, par étude d'immunofluorescence indirecte, le marquage de la polycystine-1 (figure 15A) et de la E-cadhérine (figure 15B) se chevauche partiellement au niveau des jonctions adhérentes, peu importe le stade de confluence des cellules. Le marquage de la polycystine-1 et de la E-cadhérine en jaune est également, au niveau des cellules intestinales, un signe de co-localisation (figure 15C). Le marquage de la polycystine-1 (figure 16A) et de la ZK-31 (figure 16B) se superpose totalement (marquage en jaune de la figure 16C) au niveau des desmosomes et ce également peu importe la

confluence des cellules Caco-2/15. La polycystine-1 co-localise partiellement avec la E-cadhérine des jonctions adhérentes et totalement avec l'antigène desmosomal dans l'épithélium intestinal humain tant in vivo qu'in vitro. Ceci correspond à une première évidence de la localisation de la polycystine-1 dans les jonctions intercellulaires.

Figure 13. Étude de la co-localisation (pour jonction adhérente) de la polycystine-1 et la E-cadhérine dans l'intestin foetal et adulte humain par immunofluorescence indirecte. Les tissus intestinaux humains ont été fixés au méthanol, bloqués avec du blotto 10% et soumis à une immunodétection pour l'antigène de la PC-1 (A et B) et de la E-cadhérine (C et D) en même temps. La co-localisation entre la PC-1 et la E-cadhérine dans les tissus humains est partielle (E et F).

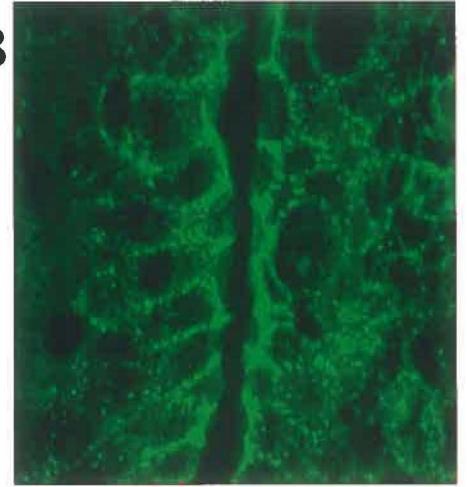
Foetal

Adulte

A

B

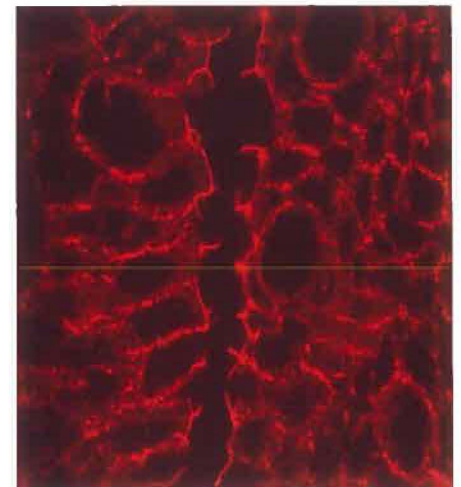
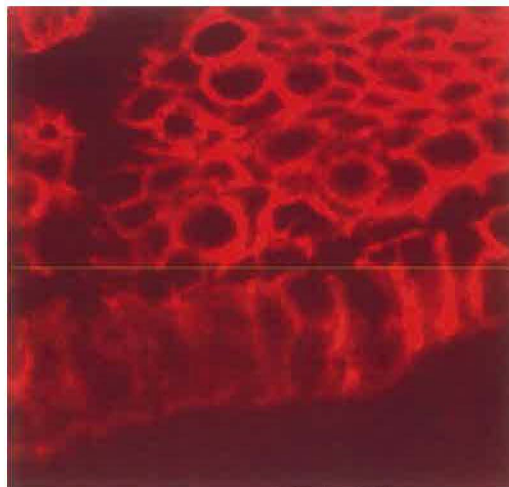
E-cadhérine



C

D

PC-1



E

F

E-cadhérine
et PC-1

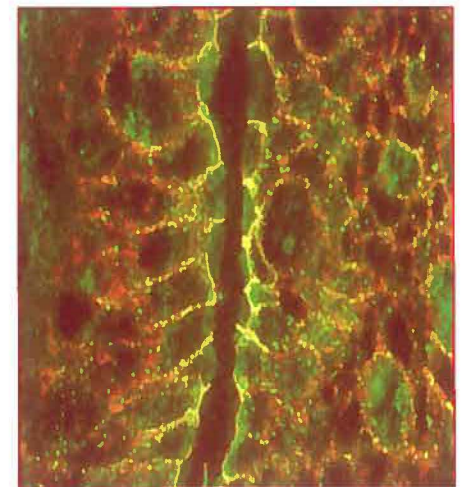
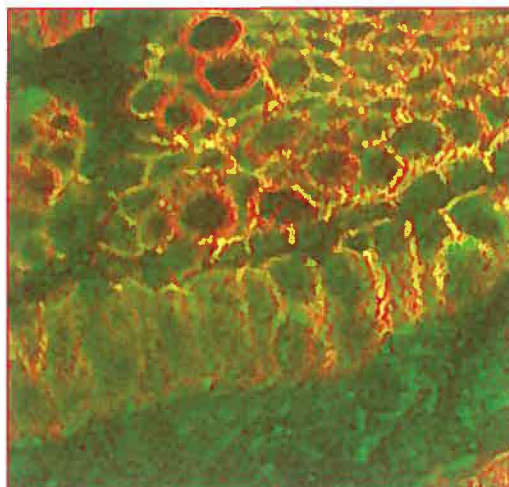
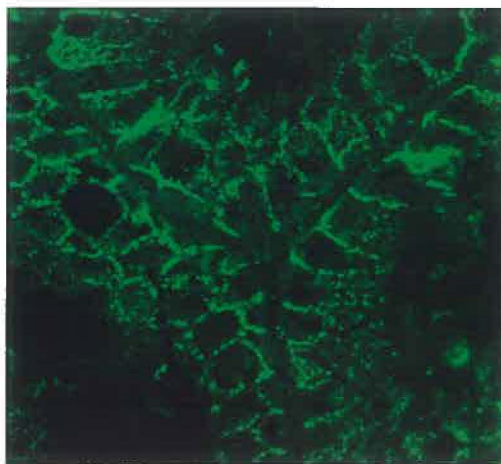


Figure 14. Étude de la co-localisation (pour desmosome) de la polycystine-1 et de la ZK-31 dans l'intestin foetal et adulte humain par immunofluorescence indirecte. Les tissus intestinaux humains ont été fixés au méthanol, bloqués avec du blotto 10% et soumis à une immunodétection pour l'antigène de la PC-1 (A et B) et de la ZK-31 (C et D) en même temps. La co-localisation entre la PC-1 et la ZK-31 dans les tissus humains est totale tant pour le foetal que l'adulte (E et F).

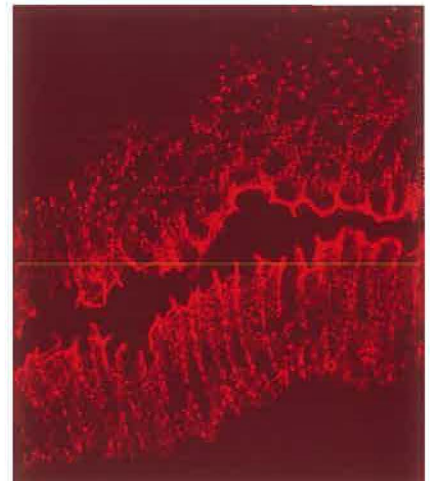
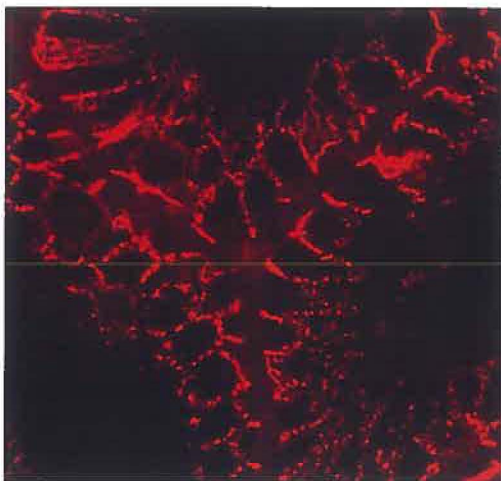
Fœtal

Adulte

ZK-31



PC-1



ZK-31 et PC-1

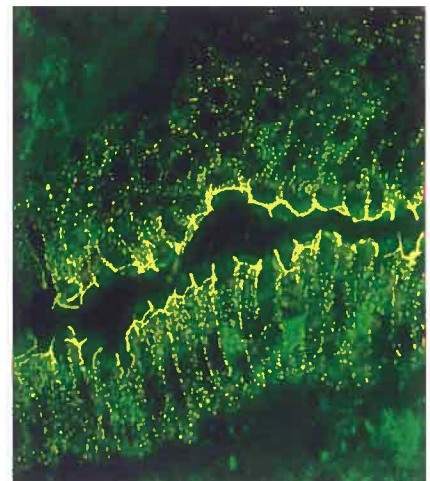
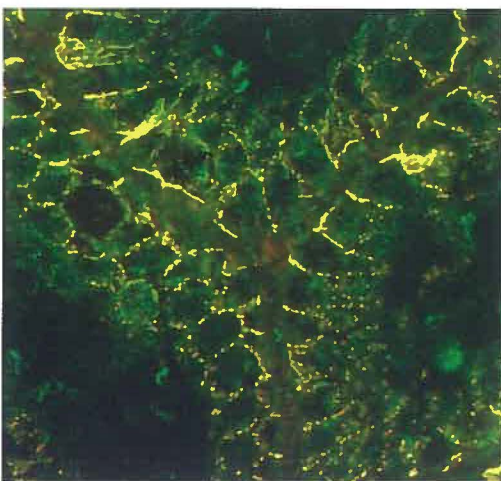
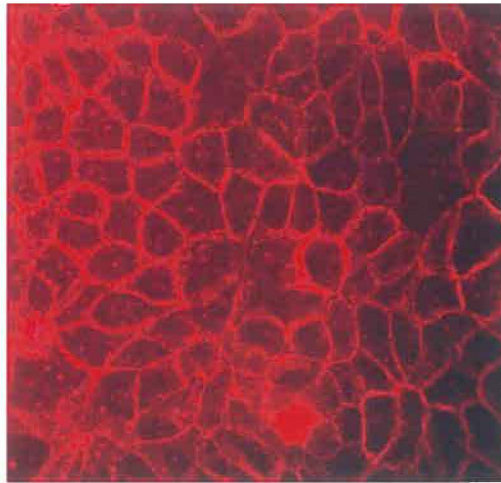


Figure 15. Étude de la co-localisation (pour jonction adhérente) de la polycystine-1 et la E-cadhérine dans les Caco-2/15. Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum (FBS) jusqu'à 10 jours de confluence. Par la suite, les cellules ont été fixées et soumis à une immunodétection pour l'antigène de la PC-1 (rouge) et de la E-cadhérine (vert). Les antigènes de la PC-1 (A) et de la E-cadhérine (B) se retrouvent aux niveaux des jonctions intercellulaires et co-localisent partiellement (C).

Caco-2/15 +10 jours confluence

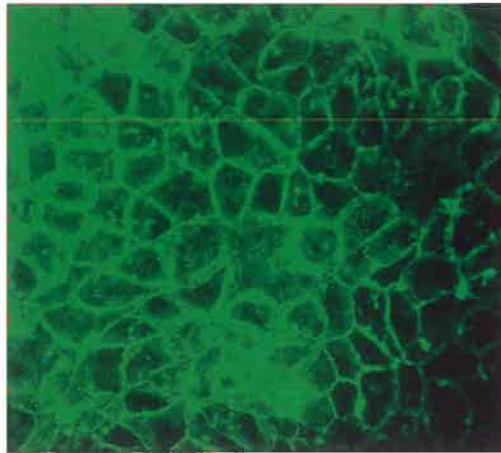
PC-1

A



E-cadhérine

B



PC-1 + E-Cadhérine

C

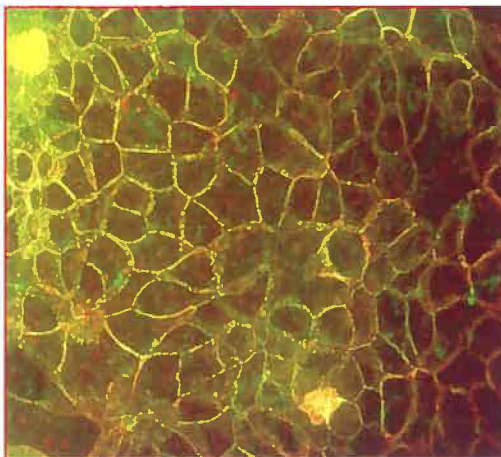


Figure 16. Étude de la co-localisation (pour desmosome) de la polycystine-1 et de la ZK-31 dans les Caco-2/15. Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum (FBS) jusqu'à 10 jours de confluence. Par la suite, les cellules ont été fixées et soumis à une immunodétection pour l'antigène de la PC-1 (lapin) et de la ZK-31 (souris). Les antigènes de la PC-1 (A) et de la ZK-31 (B) se retrouvent aux niveaux des jonctions intercellulaires et co-localisent totalement (jaune de la figure C).

Caco-2/15 +10 iours confluence

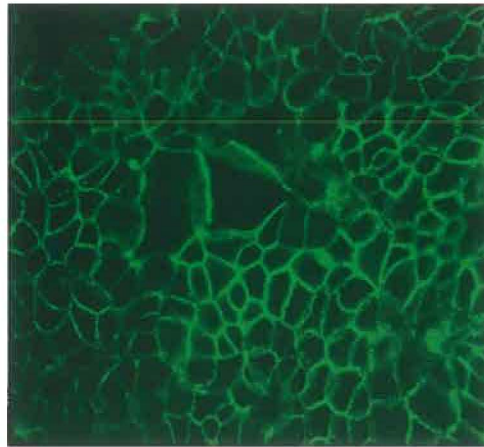
A

PC-1



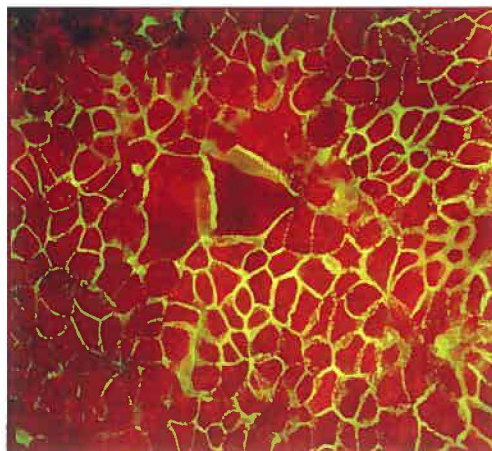
B

ZK-31



C

PC-1 et ZK-31



2.2 La localisation de la polycystine-1 par microscopie électronique

En support à ces différentes études de co-localisation avec les molécules de jonctions, la présence de la polycystine-1 a été analysée dans les jonctions adhérentes et les desmosomes par microscopie électronique. Les expériences de microscopie électronique ont été difficiles à réaliser puisque l'anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1 ne reconnaît plus son épitope dans des tissus pré-fixés à la para-formaldéhyde. Aucun marquage de la polycystine-1 avec les billes d'or n'est observable sur ces tissus humains pré-fixés au para-formaldéhyde en microscopie électronique. La fixation des tissus fœtaux de 17 semaines a donc dû être omise. Les différents tissus ont été inclus dans un gradient de sucrose afin de conserver le plus possible les différentes structures des tissus. La figure 17 représente deux cellules épithéliales possédant une zonula adherens marquée avec de l'or de 10nm. Les différentes jonctions sont discernables par une morphologie distinctes comprenant des structures plus denses et compactes au contact cellule-cellule. La représentation à 10000X de la figure 17 montre la bordure en brosse (BBR) et le noyau (N) comme points de repaire. Aucun marquage de la polycystine-1 n'est observé dans les structures et membranes adjacentes. La figure 18 expose deux desmosomes qui se suivent marqués également avec de l'or 10 nm (polycystine-1 est aussi l'anticorps primaire utilisé). Pour cette figure, le marquage de la polycystine-1 est aussi spécifique aux desmosomes.

Ces expériences en microscopie électronique nous montrent que la polycystine-1 se localise bien au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes dans les cellules épithéliales intestinales humaines.

Figures 17. Immunolocalisation de la polycystine-1 dans une jonction adhérente de l'épithélium de l'intestin fœtal humain par microscopie électronique à transmission. Les tissus de 17 semaines de gestation non-fixés ont été inclus dans une solution de glucose 2.3 M. L'immunodétection a été réalisée avec l'anticorps primaire reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1 et un anticorps secondaire de lapin couplé à l'or (10 nm). Les structures plus denses et compactes représentent les jonctions intercellulaires au contact cellule-cellule. La bordure en brosse (BBR) et le noyau(N) sont les points de repère. La jonction adhérente remarquée par l'indication de la flèche rouge renferme la PC-1 identifiable par les petits points noirs (or).

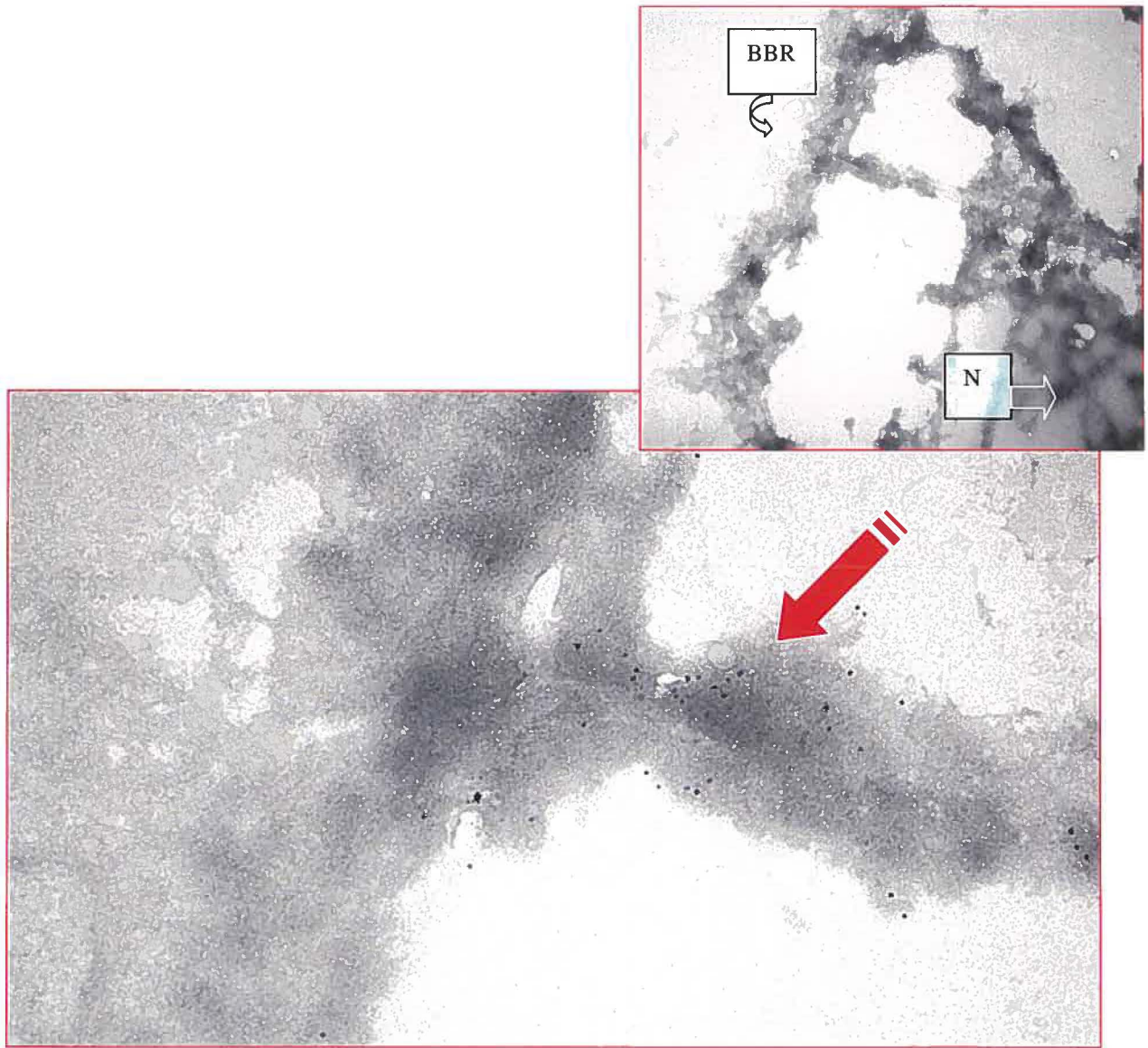
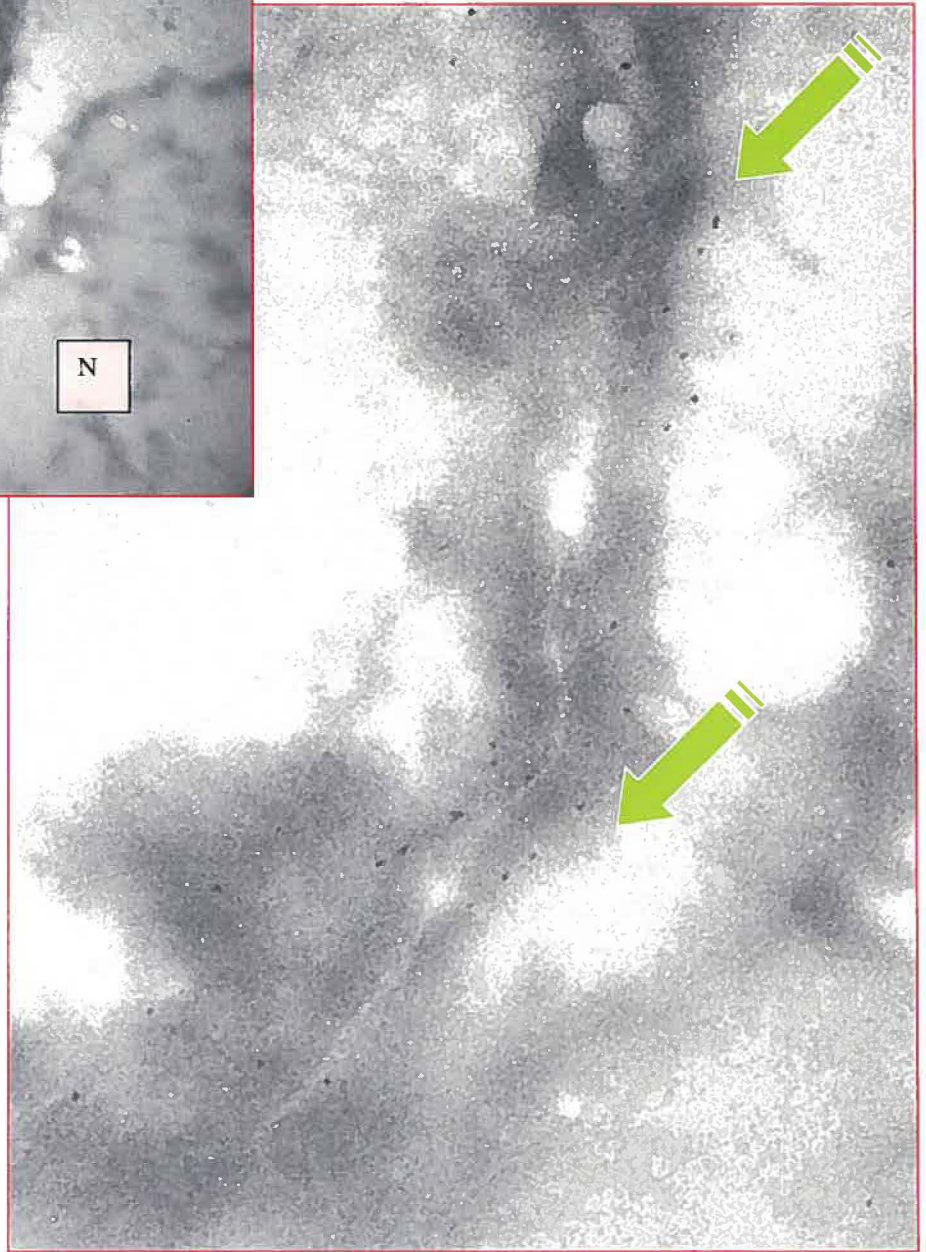
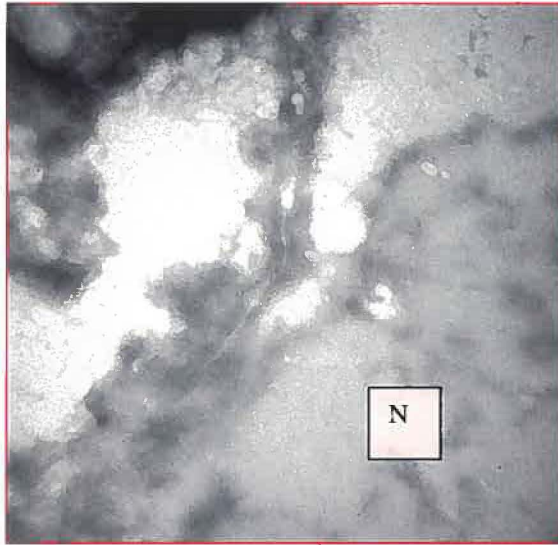


Figure 18. Immunolocalisation de la polycystine-1 dans les desmosomes de l'épithélium de l'intestin foetal humain par microscopie électronique à transmission. Les tissus de 17 semaines de gestation non-fixés ont été inclus dans une solution de glucose 2.3 M. L'immunodétection a été réalisé avec l'anticorps primaire reconnaissant spécifiquement le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1 et un anticorps secondaire de lapin couplé à l'or (10 nm). Les structures plus denses et compactes représentent les jonctions intercellulaires au contact cellule-cellule. Les desmosomes sont remarqués par l'indication de la flèche verte tandis que la PC-1 est représentée par des petits points noirs (or).



2.3 Isolement de la polycystine-1 comme étant une protéine associée au cytosquelette

Plusieurs études ont déjà démontré que les protéines de jonctions cellulaires comme celles des jonctions adhérentes sont liées directement au cytosquelette (Hülsken et al., 1994; Peters D.J. et al., 1999). Par traitement au Triton X-100, un détergent non-ionique, il est possible de solubiliser les protéines des membranes cellulaires ainsi que celles du cytosol alors que les protéines associées au cytosquelette demeurent dans la fraction insoluble. Lorsque les cellules épithéliales intestinales sont traitées avec une solution de Triton X-100 1% avant la fixation, le marquage de la polycystine-1 et de la E-cadhérine à la jonction intercellulaire de la membrane plasmique est conservé uniquement pour les cellules Caco-2/15 (figure 19A) alors que le marquage intracellulaire de la polycystine-1 dans les cellules HIEC disparaît après le traitement au Triton X-100 1% (figure 19B). Des études de co-localisation montrent que les co-localisations partielle pour la E-cadhérine des jonctions adhérentes et totale pour la Zk-31 des desmosomes avec la polycystine-1 demeurent dans les cellules Caco-2/15 après traitement au Triton X-100 (résultats non-montrés).

Par immunobuvardage de type Western, les fractions solubles et insolubles des cellules HIEC et les Caco-2/15 traitées au Triton X-100 ont été analysées (figure 19C) avec un anticorps polyclonal reconnaissant le domaine LRR (α -leucine-rich repeat) de la région extracellulaire de la polycystine-1. Dans les

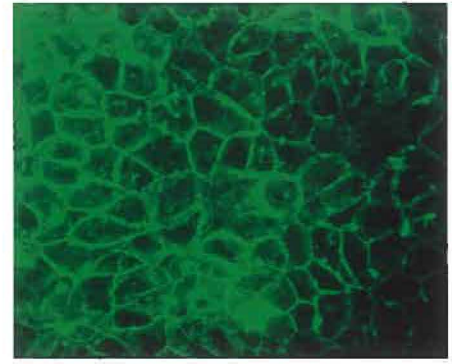
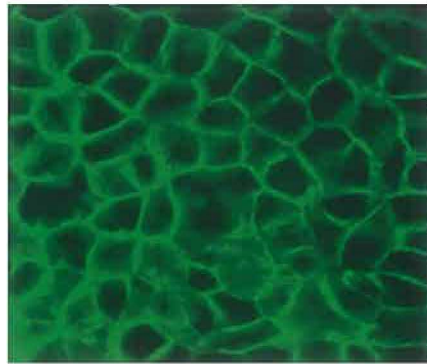
cellules HIEC, la forme à 480 KDa est visible dans les fractions soluble (figure 19C, piste 4) et insoluble (figure 19C piste 3). Dans les cellules Caco-2/15, le précurseur à 480 KDa de la polycystine-1 est aussi percevable dans la fraction soluble, ainsi que les fragments clivés de la protéine aux alentours de 250 KDa (figure 19C piste 2). Dans la fraction insoluble, il est possible de voir exclusivement les fragments clivés de la polycystine-1 (figure 19C piste 1). Le clivage de la polycystine-1 pourrait possiblement être important dans notre modèle cellulaire Caco-2/15 pour sa localisation à la membrane. Le clivage aberrant de certaines protéines comme le TGF alpha dans les lignées cellulaires de carcinomes de colon humain a déjà été observées (Yang H. et al., 2000). Il est alors important de se questionner sur la nature cancéreuse des cellules Caco-2/15 et leur rôle potentiel dans la nature du clivage de la polycystine-1. Dans nos expériences, la nature cancéreuse des cellules Caco-2/15 ne semble pas influencer la clivage de la polycystine-1 puisque des bandes de masse similaire sont retrouvées dans les modèles cellulaires normaux comme les MDCK et les IMCD. Ces résultats suggèrent que la polycystine-1 est liée aux cytosquelette dans les cellules polarisées, Caco-2/15.

Figure 19. Isolement de la polycystine-1 comme étant une protéine associée au cytosquelette par des études d'immunofluorescence indirecte et d'immunobuvardage de type western sur les cellules HIEC et Caco-2/15. A et B) Les cellules HIEC et Caco-2/15 ont été traitées avec un tampon de lyse/stabilisation du cytosquelette composé de triton X-100 1% pour 30 minutes et ont subi une immunofluorescence indirecte. A) Pour les Caco-2/15, le marquage de la polycystine-1 (rouge) et de la E-cadhérine (vert) demeure après le traitement. Une indication que la polycystine-1 est liée au cytosquelette dans les Caco-2/15. B) Le marquage de la polycystine-1 (rouge) au niveau intracellulaire est dissipé après le traitement au Triton X-100 1%. C) Les cellules intestinales ont aussi été traitées avec un tampon de lyse/stabilisation du cytosquelette composé de triton X-100 1% pour 30 minutes. Après 20 minutes de centrifugation, la partie soluble du lysat cellulaire est recueillie. La partie insoluble est traitée au tampon Laemmli 1X. Avec l'anticorps de la polycystine-1, la protéine à 480 kDa est recueillie dans les fractions de HIEC et dans la partie soluble des Caco-2/15. Dans la fraction insoluble des Caco-2/15, des fragments aux alentours de 250 kDa sont retrouvés. La piste 1 représente la fraction soluble HIEC. La piste 2 représente la fraction insoluble HIEC. La piste 3 représente la partie soluble Caco-2/15. La piste 4 représente la partie insoluble Caco-2/15.

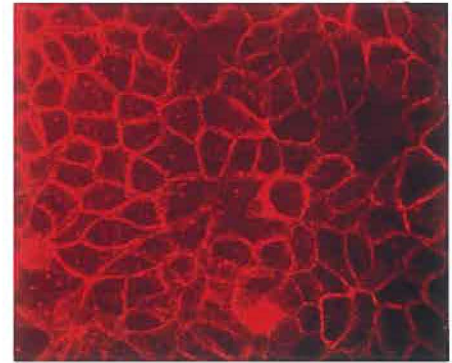
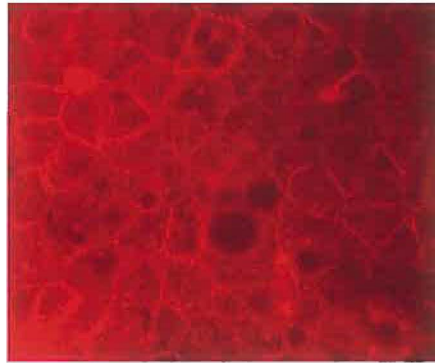
Caco-2/15+ 10 non-traité

Caco-2/15 +10 traité

E-cadhérine



PC-1

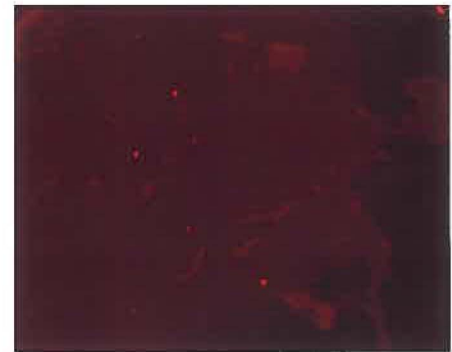
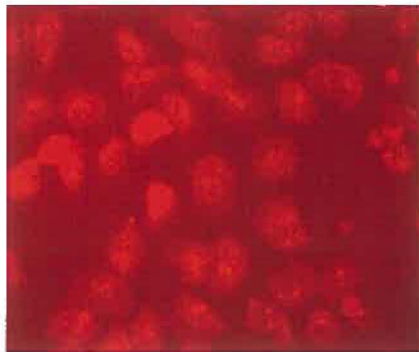


B

HIEC 0 non-traité

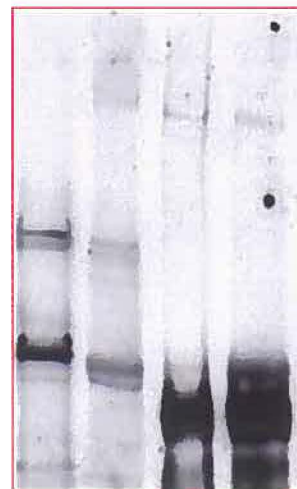
HIEC 0 traité

PC-1



C

1 2 3 4



← 480 KDa

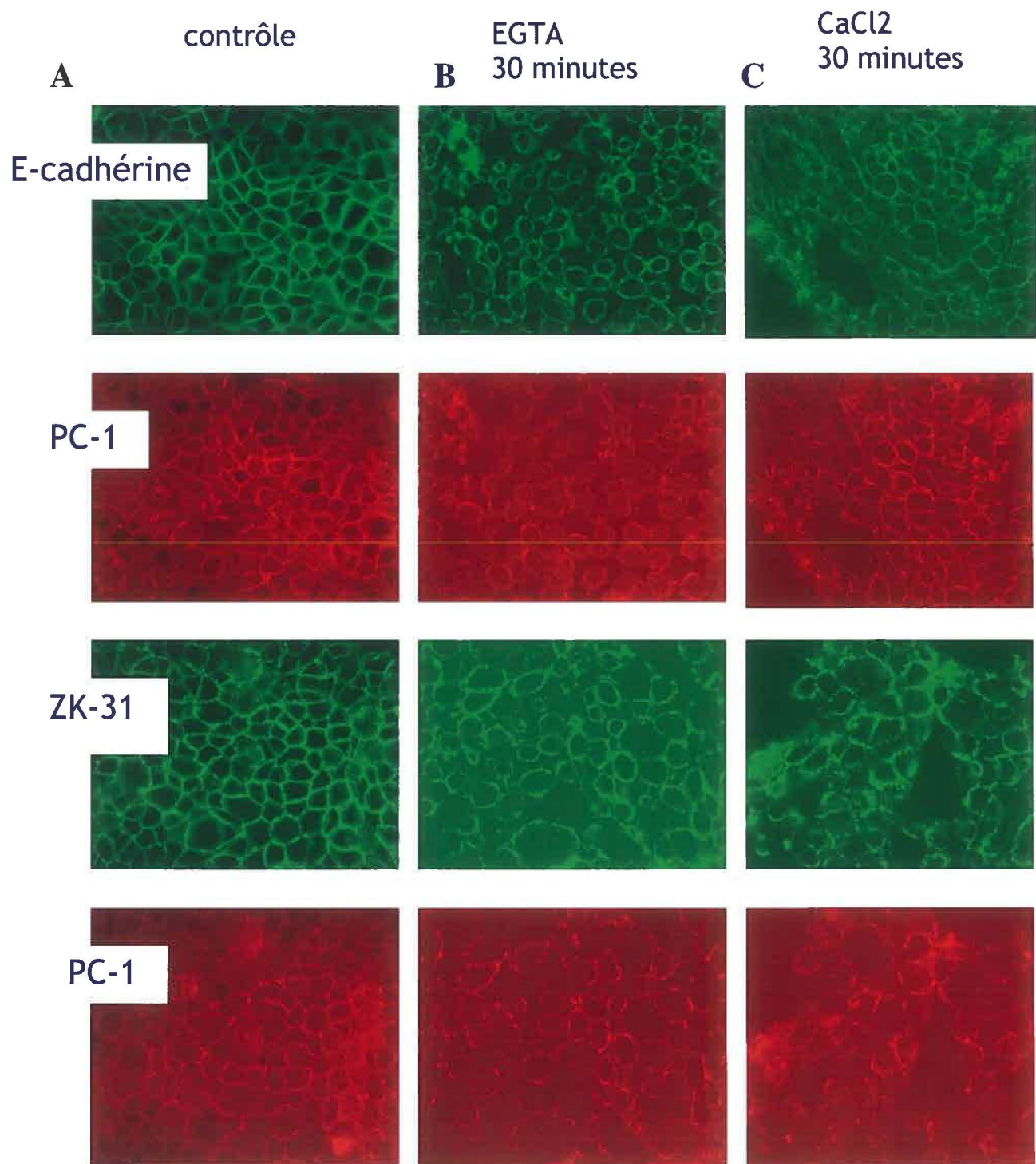
← 250 KDa

2.4 Inhibition et restauration des jonctions cellulaires

Une autre évidence qui permet de confirmer l'association directe ou indirecte de la polycystine-1 avec les jonctions adhérentes et les desmosomes sont les expériences de « calcium switch » (Sheffers M.S. et al., 2000). L'intégrité des différentes jonctions intercellulaires est complètement mise en jeu par ces expériences de « calcium switch » (Jones J.C. et Goldman R.D., 1985). Initialement, le marquage de la E-cadhérine, de la ZK-31 et de la polycystine-1 dans les Caco-2/15 se localise au niveau des jonctions intercellulaires (figure 20A). Après le traitement de 30 minutes au chélateur de calcium, EGTA 4 mM, le marquage de la E-cadhérine, de la ZK-31 et de la polycystine-1 se retrouve sous une forme diffuse en périphérie des cellules Caco-2/15 (figure 20B). Les différents temps d'incubation avec l'EGTA 4 mM et le calcium 1.8 mM ont été démontrés préalablement et proviennent de la littérature (Mattey DL et Garrod DR, 1986; Pece et al. 1999; Laprise p. et al., 2002). 30 minutes après rétablissement du CaCl_2 , la restauration des jonctions cellulaires est visible par le marquage à nouveau de la E-cadhérine, de la ZK-31 et de la polycystine-1 (figure 20C) au niveau des jonctions intercellulaires. La polycystine-1 semble suivre le patron d'inhibition (perte de sa localisation dans jonctions intercellulaires) et de restauration des jonctions intercellulaires mis en évidence par le marquage de la E-cadhérine et de la ZK-31 dans les Caco-2/15.

Figure 20. Inhibition et restauration des jonctions intercellulaires par expérience de « calcium switch ». Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum (FBS) jusqu'à 2 jours de confluence. Les cellules caco-2/15 ont été ensuite privées en sérum 16 heures avant le traitement au EGTA 4 mM. A) La polycystine-1, la E-cadhérine et la ZK-31 se localisent à la jonction intercellulaire avant les traitements. B) 30 minutes après le traitement au EGTA 4 mM, la polycystine-1, la E-cadhérine et la ZK-31 se retrouvent en périphérie de la cellule. Les jonctions cellulaires ont été inhibées. C) 30 minutes après le traitement au CaCl_2 1.8 mM, la polycystine-1, la E-cadhérine et la ZK-31 se retrouvent de nouveau à la jonction intercellulaire. Les concentrations adéquates de calcium permettent la restauration des jonctions intercellulaires qui sont calcium dépendantes.

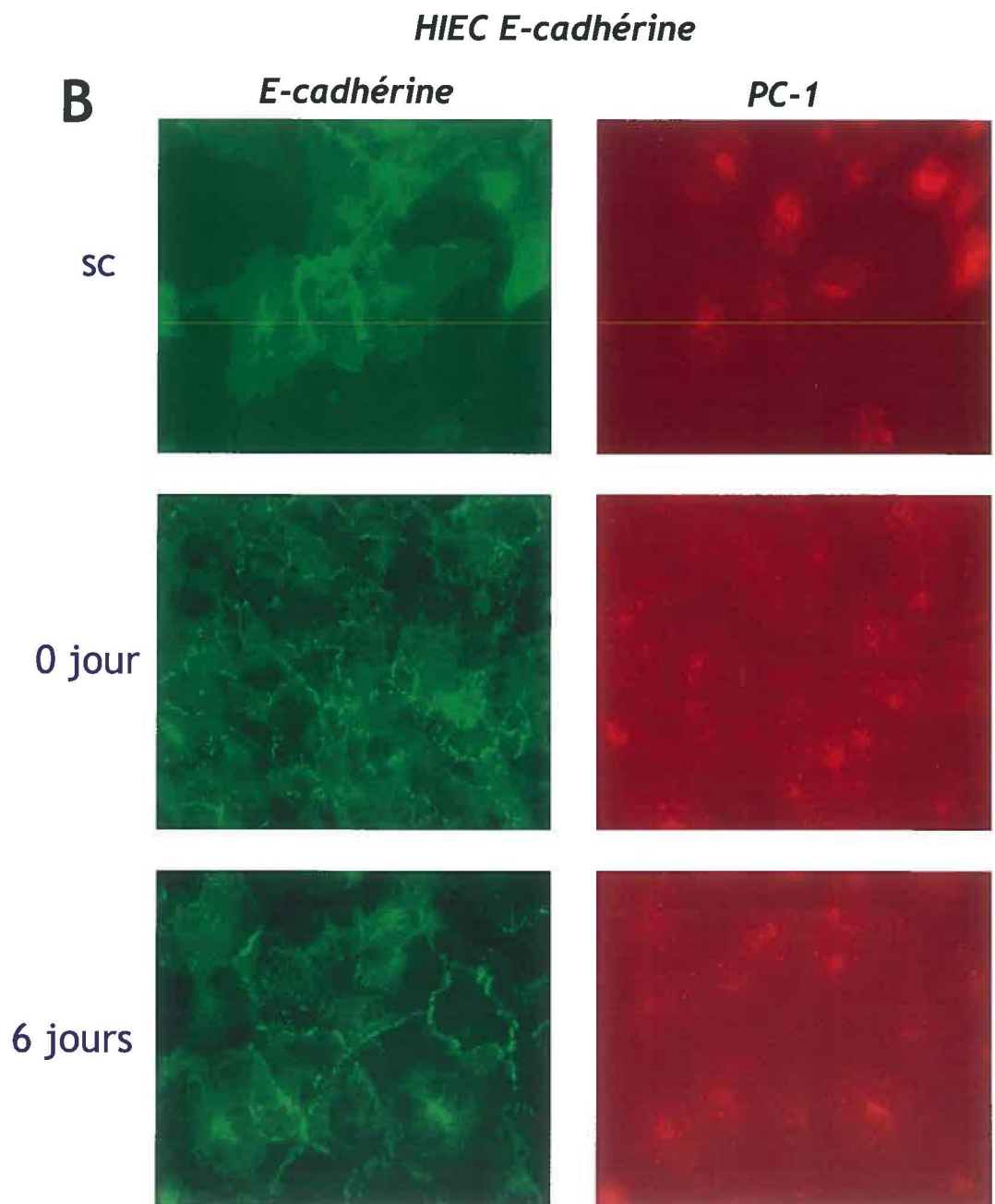
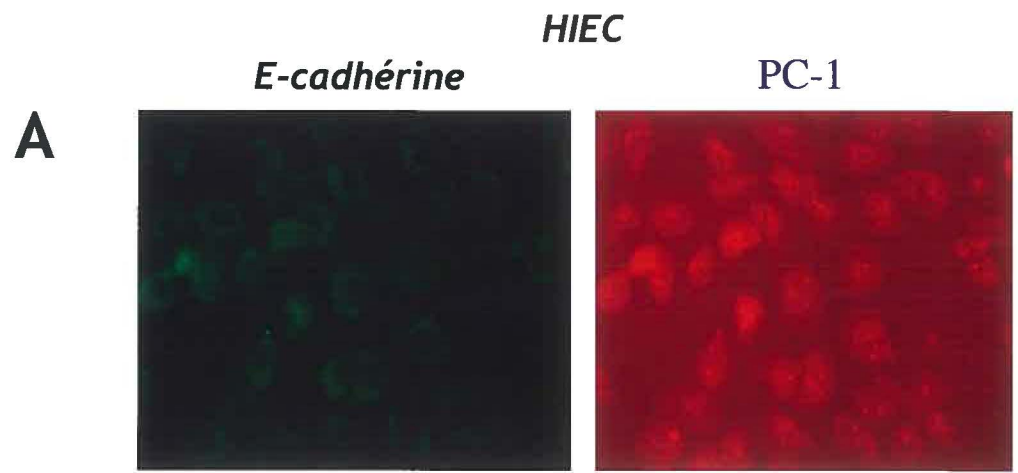
Caco-2/15 +2 jours



3. La polycystine-1 dans les cellules HIEC E-cadhérine

Une association directe de la polycystine-1 et de la E-cadhérine a déjà été démontrée par immunoprécipitation dans des cellules de rein et de pancréas humain (Roitback T. et al., 2004; Huan Y. et Adelsberg J.V., 1999). Des études ont également dévoilé que la polycystine-1 et la E-cadhérine ne dépendent pas l'une de l'autre pour se retrouver à la membrane plasmique (Bukanov N.O. et al., 2002). Les cellules HIEC ont la particularité de ne pas exprimer la E-cadhérine et certaines protéines desmosomales. Le marquage de la polycystine-1 dans les cellules HIEC se localise au niveau intracellulaire (figure 21A). Afin de vérifier si la réintroduction de la E-cadhérine permet à la polycystine-1 de se localiser à la membrane plasmique des cellules HIEC, nous avons utilisé des cellules HIEC qui expriment de façon stable la E-cadhérine. Nos résultats montrent que la polycystine-1 demeure localisée au niveau intracellulaire et ce même après 6 jours de post-confluence (figure 21B). La réintroduction de la E-cadhérine dans les cellules HIEC n'est pas suffisante pour amener la polycystine-1 à la membrane des ces cellules.

Figure 21. La réintroduction de la E-cadhérine dans les cellules HIEC et la localisation de la PC-1. A) Le marquage de la polycystine-1 (rouge) avec l'anticorps reconnaissant spécifiquement le domaine LRR de la polycystine-1 dans les cellules HIEC se localise au niveau intracellulaire. Le marquage pour le E-cadhérine est négatif puisqu'il n'y a pas de E-cadhérine dans ce type de cellule intestinale. B) F. Escaffit du groupe de biologie cellulaire a produit une lignée cellulaire stable de HIEC exprimant la E-cadhérine aux jonctions intercellulaires (marquage en vert). La réintroduction de la E-cadhérine dans les cellules HIEC n'est pas suffisante pour amener la PC-1 (marquage en rouge) à la membrane plasmique et ce même après six jours de confluence.



4. Identification du cilium primaire dans l'épithélium intestinal

L'intérêt de notre étude s'est tourné premièrement à vérifier la présence du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain. L'identification du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain a été vaine jusqu'à maintenant (Wheatley et al., 1996). Un anticorps monoclonal anti-tubuline- α acétylée a été utilisé initialement au niveau du rein foetal, par immunofluorescence indirecte, pour s'assurer de sa spécificité pour le cilium primaire. La tubuline- α acétylée est employée préférentiellement à la tubuline, car elle est concentrée au niveau de cette structure cellulaire. Des cilia primaires, marqués en vert sur la figure 22, sont présents au niveau des tubules rénaux foetaux de 17 semaines de gestation, par étude d'immunofluorescence indirecte. Les cilia primaires observés au niveau du rein s'apparente à la structure présentée dans les études de Pazour et Rosenbaum (2002).

Nous avons trouvé que les cellules HIEC possèdent des cilia primaires bien définies détectables par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps dirigé contre la tubuline- α acétylée (figure 23A). Des études de microscopie à balayage (SEM) sur des cellules HIEC ont ensuite été effectuées afin de confirmer les résultats. En se référant à la figure 24, les cilia primaires sont bien visibles. La structure observée s'apparente à ce qui a déjà été rapporté dans la littérature pour le rein (voir figure 7A de l'intro) (Wheatley D.N. et al., 1996). Par contre, aucun cilium primaire n'est détecté dans les Caco-2/15

par immunofluorescence indirecte et ce peu importe le stade de confluence des cellules (figure 23B). Le seul marquage visible est le marquage du réseau de microtubule qui est aussi reconnu par l'anticorps de la tubuline- α acétylée. Nous avons également analysé l'expression de la tubuline- α acétylée par immunofluorescence indirecte dans l'intestin humain foetal et adulte. Pour l'intestin foetal humain, un marquage diffus au niveau des cellules épithéliales du fond de la crypte est observé (figure 25B). Pour l'intestin adulte humain, ce marquage diffus semble être présent, mais il est également possible de détecter des structures qui s'apparentent à des cilia primaires matures au niveau des cellules épithéliales de quelques cryptes (figure 25A).

Figure 22. Spécificité de l'anticorps de la tubuline- α acétylée pour le cilium primaire du rein fœtal humain. Immunofluorescence indirecte sur un rein fœtal de 17 semaine avec la tubuline acétylée pour identifier des cilia primaires dans le rein fœtal humain. L'anticorps pour identifier le cilium primaire est spécifique puisque les structures en vert sont les cilia primaires.

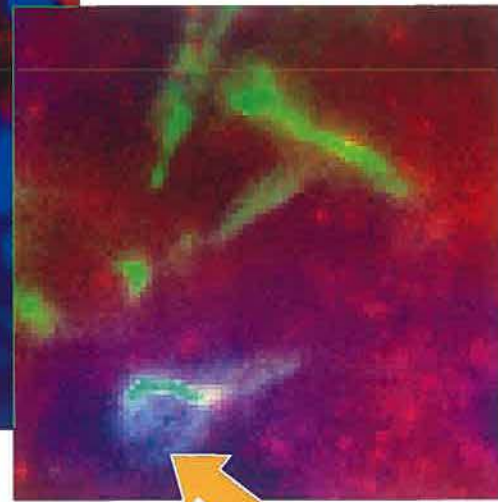
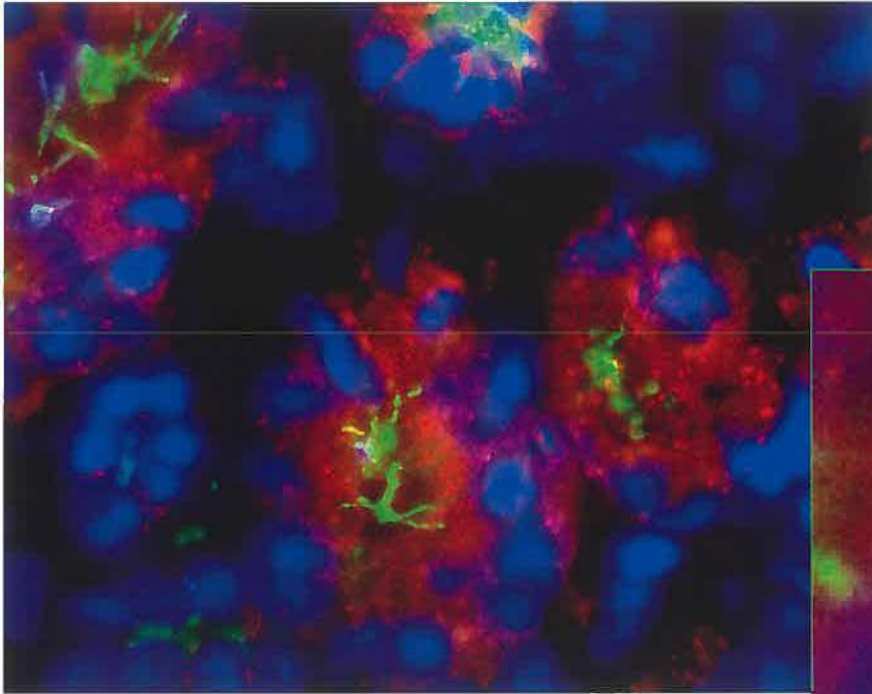
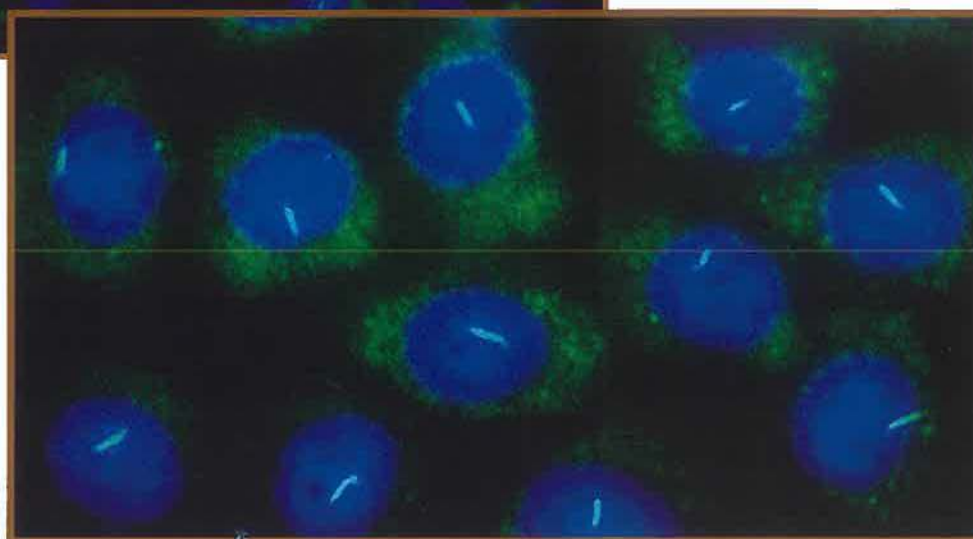
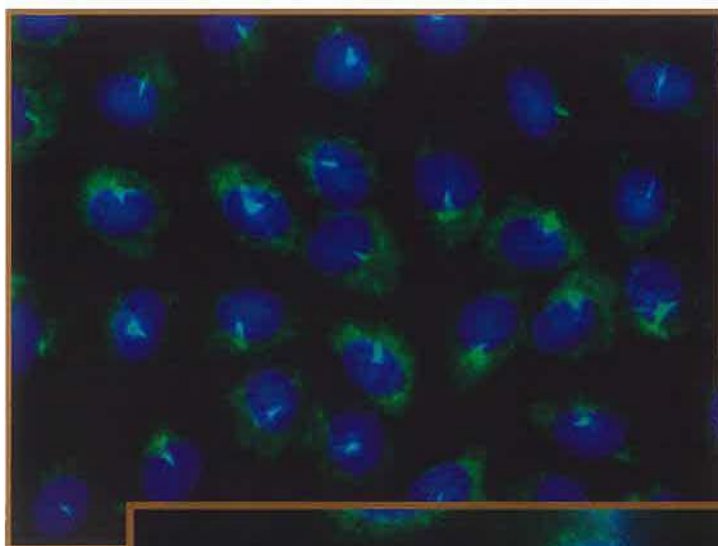


Figure 23. Immunodétection de cilium primaire dans les modèles cellulaires de l'épithélium intestinal humain, les HIEC et les Caco-2/15. Les cellules HIEC ont été cultivées dans un milieu optimem supplémenté de 4% en sérum (FBS) tandis que les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum (FBS). A) Immunofluorescence indirecte avec l'anticorps monoclonal de la tubuline- α acétylée sur les HIEC afin d'identifier des cilia primaires. Les cellules ont tout d'abord été fixées au méthanol. Les HIEC possèdent un cilium primaire d'environ 1.5 μ m sur chaque cellule. B) Immunofluorescence indirecte sur les Caco-2/15 avec l'anticorps spécifique pour les cilia primaires. Aucun cilium primaire n'a été identifié, simplement du marquage au niveau du réseau de microtubules.

A



B

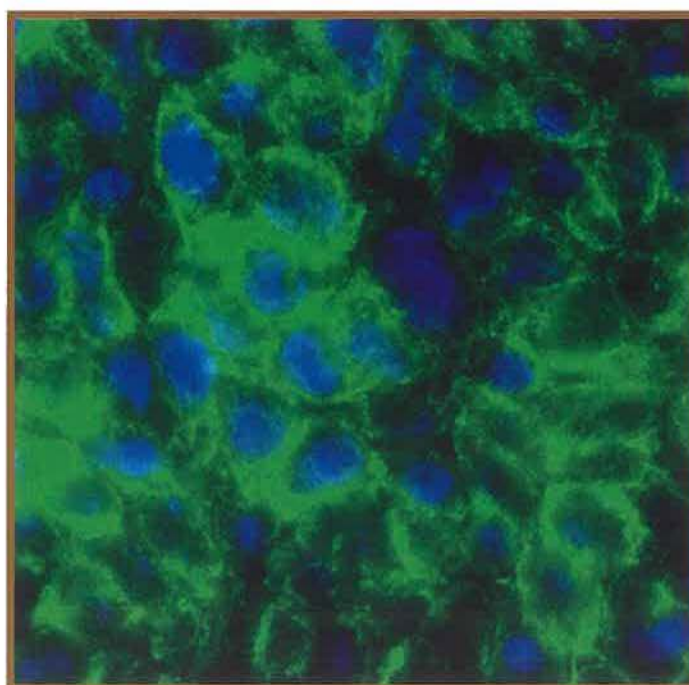


Figure 24. Étude de microscopie à balayage (SEM) afin d'identifier la présence de cilia primaires à la surface des cellules épithéliales intestinales humaines, les HIEC. Les cellules HIEC ont été fixées à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde 2.5%. Même à une représentation à 2000X, le cilium primaire d'environ 1.5 μm est visible à la surface des cellules HIEC. Les cilia sont indiqués sur les représentations à 2000x, à 5000x et à 7500X par une flèche bleue.

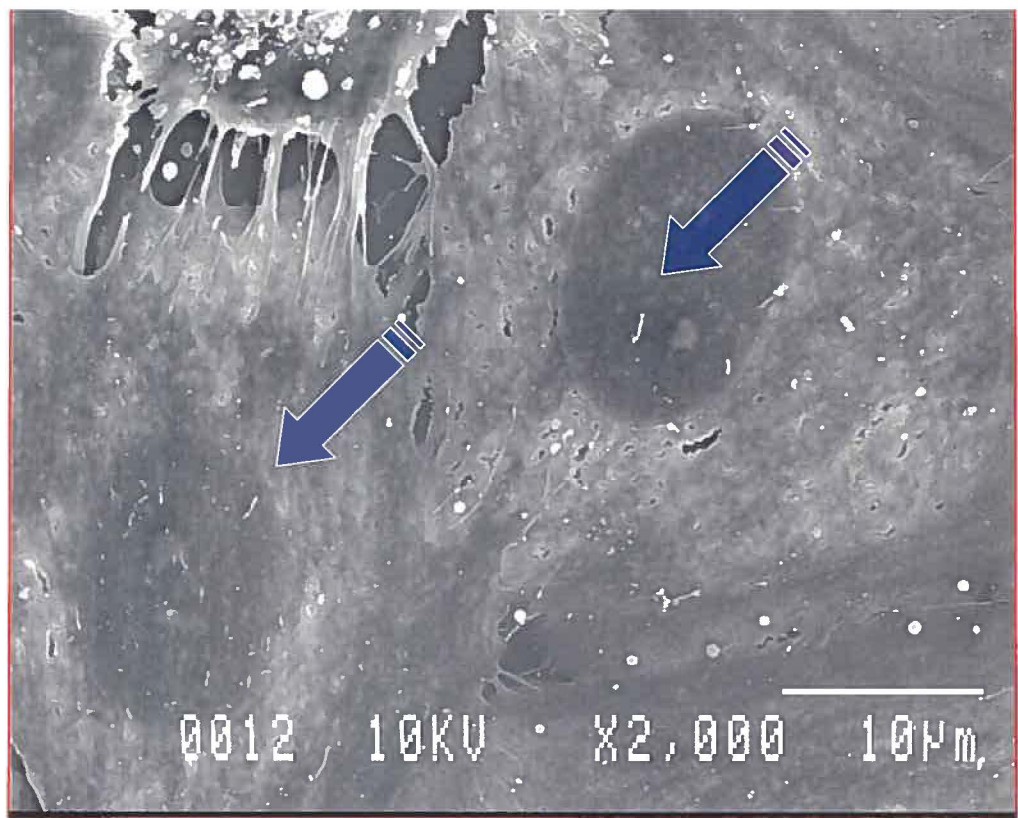
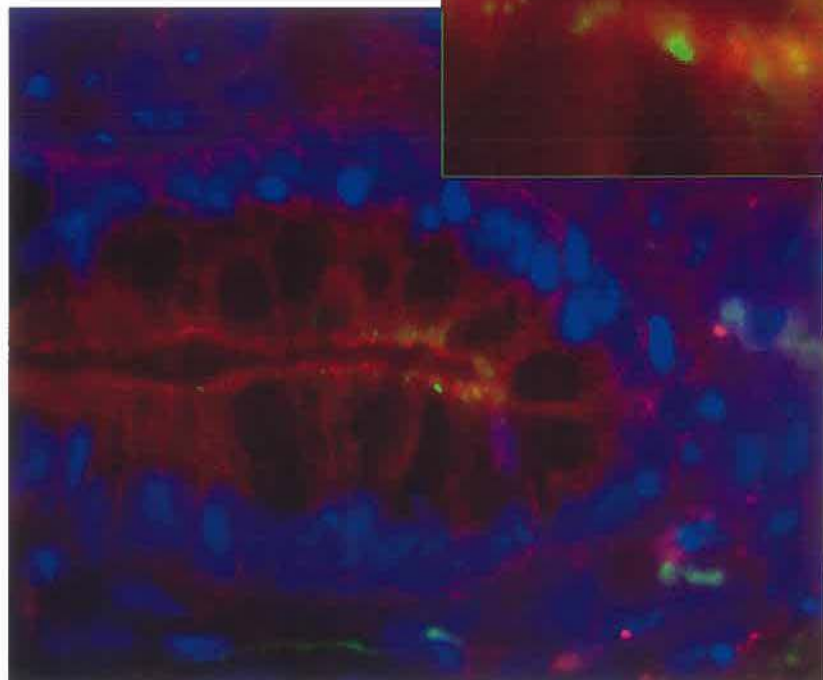
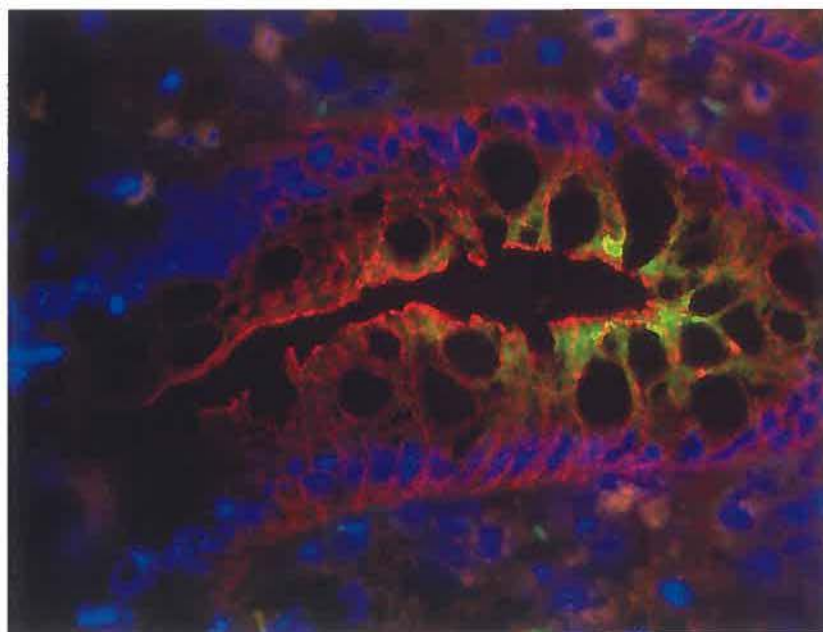


Figure 25. Immunodétection du cilium primaire avec l'anticorps monoclonal de la tubuline- α acétylée dans l'épithélium intestinal humain in vivo. A) Immunofluorescence indirecte sur un tissu adulte sain. Le marquage pour le cilium primaire se retrouve à la surface des cellules épithéliales de l'intestin du fond de la crypte. Un seul cilium est retrouvé dans certaines cryptes comme celles montrées dans cette représentation en microscopie à fluorescence. B) Immunofluorescence sur un tissu fœtal humain de 17 semaines. Le marquage spécifique et diffus pour le cilium primaire des cellules épithéliales intestinales fœtales se retrouve au fond des cryptes.

A



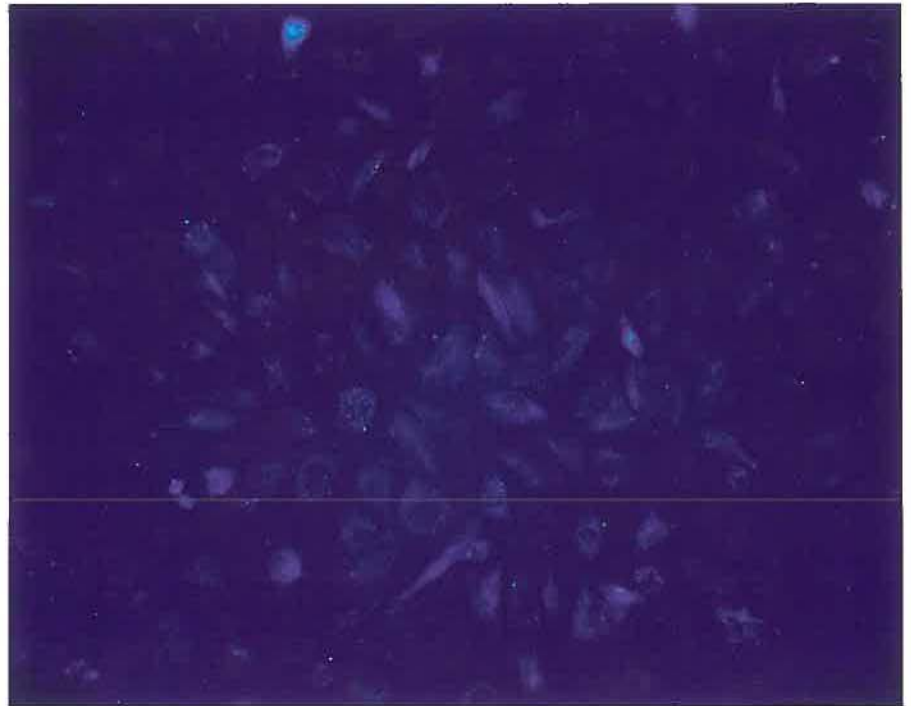
B



5. La fonctionnement du cilium primaire dans les cellules HIEC

La question maintenant est de savoir si le cilium primaire présent dans les cellules HIEC est fonctionnel. Praetorius et Spring (2001) ont mis en évidence que le recourbement du cilium primaire à la surface des cellules MDCK, par l'augmentation de la circulation de liquide au-dessus des cellules (essai de perfusion), permet l'augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation de calcium intracellulaire démontre que le cilium primaire est sensible mécaniquement et peut servir de senseur de flux. Afin de vérifier cette interprétation, les cellules HIEC ont été incubées avec un indicateur fluorescent et soumises à un flux liquide visant à faire plier le cilium primaire présent à la surface des cellules HIEC. Les changements de calcium intracellulaire libres ont alors été mesurés. La légende colorée à la figure 26 indique le niveau d'intensité de fluorescence. Avant le passage du flux de la perfusion, le niveau d'intensité de fluorescence des cellules HIEC est relativement faible (figure 26). Après le passage de la solution à perfusion a une intensité de 5, une augmentation significative de calcium intracellulaire est observable de façon rapide et transitoire par une augmentation de l'intensité de couleur de la fluorescence (voir film sur CD). Nos expériences suggère que ce petit organe, le cilium primaire, dans les cellules HIEC est bien fonctionnel en réponse aux expériences de perfusion.

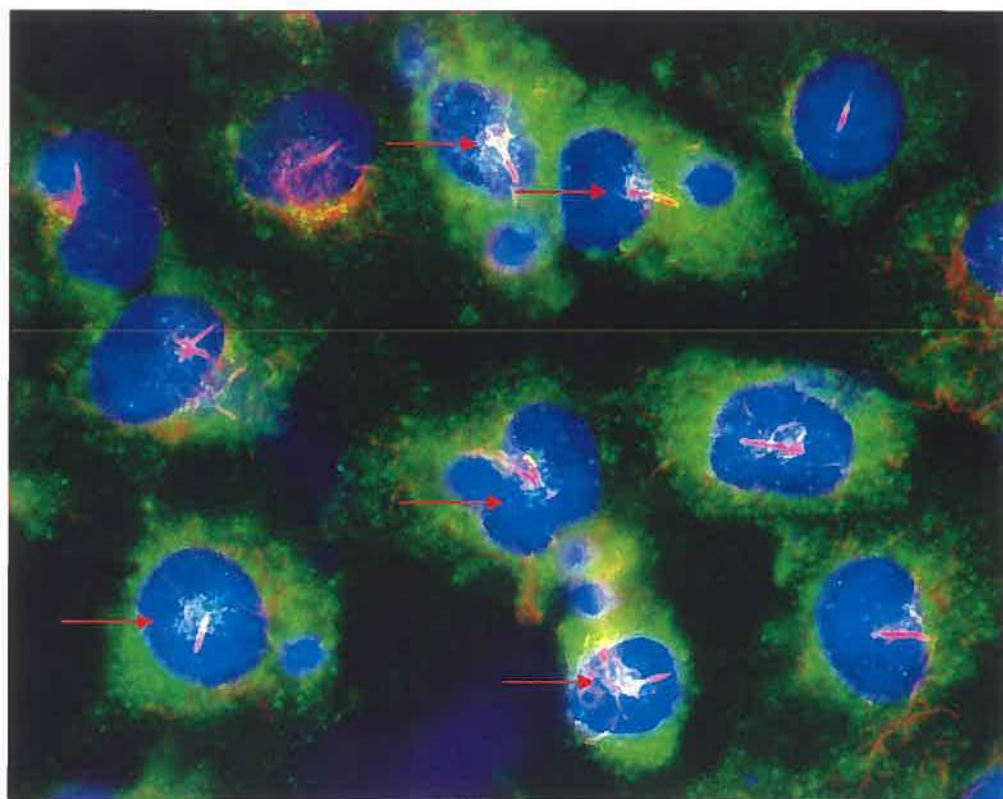
Figure 26. Validation de la fonctionnalité du cilium primaire retrouvée à la surface des cellules HIEC. La légende colorée indique le niveau d'intensité de fluorescence. Avant le passage du flux de la perfusion, le niveau d'intensité de fluorescence des cellules HIEC est relativement faible. Après le passage de la solution à perfusion à une intensité de 5, une augmentation significative de calcium intracellulaire est observable de façon rapide et transitoire par une augmentation de l'intensité de couleur de la fluorescence (voir film sur CD).



6. Co-localisation de la polycystine-1 et du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain

Notre étude démontre que la polycystine-1 et le cilium primaire se retrouvent dans l'épithélium intestinal humain. Qu'en est-il de la co-localisation de la polycystine-1 et du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain? Les études d'immunofluorescence indirecte dans les cellules HIEC avec l'anticorps polyclonal de la polycystine-1 et l'anticorps monoclonal de la tubuline- α acétylée montrent que la polycystine-1 se retrouve à la base du cilium primaire (figure 27). Cette observation suggère qu'il pourrait y avoir également un lien physiologique entre la polycystine-1 et le cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain.

Figure 27. Immunodétection de la polycystine-1 au niveau du cilium primaire dans les cellules HIEC. Un co-marquage entre l'anticorps polyclonal de la polycystine-1 et l'anticorps monoclonal de la tubuline- α acétylée a été effectué. Les cellules sont comme toujours cultivées dans un milieu optimem supplémenté de 4% en sérum (FBS). Immunofluorescence indirecte du co-marquage entre l'anticorps polyclonal de la polycystine-1 et l'anticorps monoclonal de la tubuline- α acétylée. La polycystine-1 se retrouve à la base du cilium primaire dans les cellules HIEC dans ces résultats préliminaires.



IV-DISCUSSION

La fonction physiologique de la polycystine-1 n'est pas encore connue ,mais son implication dans de multiples processus cellulaires, surtout au niveau du système rénal, est établie. Elle serait impliquée dans l'initiation de la différenciation terminale et dans la signalisation intracellulaire possiblement par sa localisation dans les jonctions cellulaires (desmosomes et jonctions adhérentes) et au niveau du cilium primaire. Son importance au niveau du système rénal a été montré dans les souris KO pour le gène *pkd1*(Lu W. et al.,1997 et Bhunia A.K.,2002). Étant donné son implication considérable dans le développement et le maintien de la cytoarchitecture des cellules épithéliales de rein, nous avons émis l'hypothèse que la polycystine-1 est impliquée dans l'acquisition et le maintien du phénotype polarisé et différencié des cellules épithéliales intestinales humaines. Afin de répondre à notre hypothèse de travail, nous avons tout d'abord cherché à déterminer 1) L'expression et la localisation de la polycystine-1 dans l'épithélium intestinal humain in vivo et dans les modèles cellulaires qui récapitulent l'axe crypte-villosité. 2) La variabilité de l'expression de la polycystine-1 selon l'état de polarité des cellules épithéliales intestinales. 3) La présence du cilium primaire au niveau de l'épithélium intestinal humain. 4) La localisation de la polycystine-1 au niveau du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain. Ces premières études sur la polycystine-1 ont permis de l'identifier et de la caractériser au niveau de l'épithélium intestinal humain. Tout d'abord, nous avons constaté

que la polycystine-1 est exprimée dans l'épithélium intestinal humain tant in vivo qu'in vitro. Dans les modèles cellulaires épithéliaux intestinaux, la localisation de la polycystine-1 varie selon l'état de polarité de ces dernières. Elle se localise au niveau des jonctions intercellulaires dans les cellules polarisées, Caco-2/15, et au niveau intracellulaire dans les cellules non-polarisées, HIEC. Étant donné son emplacement dans les jonctions intercellulaires tant in vivo qu'in vitro (Caco-2/15), il est évident qu'elle pourrait être impliquée dans l'adhésion cellulaire et dans la signalisation. La co-localisation avec la E-cadhérine et la ZK-31 sont de très bons indices. Nos résultats démontrent également que le cilium primaire est présent dans l'intestin humain et est associé à des cellules épithéliales du fond de la crypte. De plus, la fonctionnalité du cilium primaire dans les cellules HIEC a été démontrée par étude de perfusion ainsi que la localisation de la polycystine-1 à la base de ce dernier.

1. La polycystine-1 se retrouve dans l'épithélium intestinal humain et co-localise avec les jonctions adhérentes et les desmosomes.

Aucune étude sur la polycystine-1 n'a été rapportée jusqu'à maintenant dans l'intestin humain. Le premier objectif de nos recherches était d'identifier l'expression et la localisation cellulaire de la polycystine-1 dans l'épithélium intestinal humain in vivo et dans les modèles cellulaires qui récapitulent l'axe crypte-villosité. Nous avons démontré, tout d'abord, par des analyses d'immunofluorescence indirecte, que la polycystine-1 est exprimée dans l'épithélium intestinal humain in vivo (13 à 20 semaines de gestation et adultes) tout le long de l'axe crypte-villosité et ce peu importe le stade de développement. La polycystine-1 est également exprimée in vitro dans les modèles cellulaires HIEC et Caco-2/15. L'expression et la localisation de la polycystine-1 au niveau des autres tissus humains sont controversées (Scheffers M.S. et al., 2000). La distribution baso-latérale et cytoplasmique de la polycystine-1 au niveau du rein humain varie au cours de son développement (Peters D.J.M. et al., 1996 ; Adelsberg J., 1997 ; Weston B.S. et al., 1997), contrairement à ce observé dans notre étude. Il ne semble pas y avoir de modulation des niveaux d'expression de la polycystine-1 dans l'intestin humain in vivo au cours de son développement. La polycystine-1 a été identifiée dans le système rénal comme étant une protéine membranaire qui se localise au niveau des jonctions intercellulaires (les desmosomes et les jonctions adhérentes) (Scheffers M.S. et al., 2000, Bukanov N.O. et al., 2002 et Huan Y. et al., 1999).

L'emplacement de la polycystine-1 à la membrane plasmique des cellules épithéliales est capitale. Une perte de localisation de la polycystine-1 au niveau de la membrane baso-latérale amène un phénotype partiellement dédifférencié. (Bukanov N.O. et al., 2002). L'organisation et le maintien de la polarité sont essentiels pour la conservation du phénotype et de la cytoarchitecture des cellules épithéliales. Les complexes de jonctions ont aussi une grande importance. Afin de confirmer la localisation de la polycystine-1 au niveau des jonctions intercellulaires, des expériences de co-localisation avec des molécules de jonctions telles que la E-cadhérine et la ZK-31 ont été entreprises in vivo et dans nos modèles cellulaires. Une co-localisation totale de la polycystine-1 avec les desmosomes et partielle avec la E-cadhérine est observée. Même après l'extraction au Triton X-100 1%, la co-localisation de la polycystine-1 avec les molécules de jonctions demeure dans les cellule Caco-2/15. La polycystine-1 est donc une protéine associée directement ou indirectement au cytosquelette. Des expériences en microscopie électronique sur des tissus foetaux humains viennent appuyer la présence de la polycystine-1 au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes. Les rôles probables de la polycystine-1 par sa localisation dans les jonctions adhérentes et les desmosomes seront discutés à la section 3.

2. La localisation de la polycystine-1 varie selon l'état de polarité des cellules épithéliales intestinales humaines.

La polycystine-1 est exprimée dans les cellules épithéliales tubulaires rénales fœtales et adultes et son niveau d'expression diminue presque totalement à l'âge adulte (Palsson R. et al., 1996 ; Van Adelsberg J.S. et al., 1997 ; Ibrahimov-Breskrovnaya O. et al., 1997 ; Geng L. et al., 1997). Ceci a été vu autant chez l'humain que chez la souris (Geng L. et al., 1997 ; Chauvet V. et al., 2002). La polycystine-1 serait aussi associée à la tubulogénèse. Boletta et al. en 2000 ont démontré que l'expression de la polycystine-1 dans les cellules MDCK placé dans une gel 3D est suffisante à induire *in vitro* la tubulogénèse et ce sans le facteur de croissance HGF. De plus, beaucoup d'évidences au niveau du rein démontrent que la polycystine-1 est régulée temporellement au cours du développement (Chauvet et al., 2002 ; Van Adelsberg J. et al., 1997 ; Ward C.J. et al., 1996). Cette régulation différentielle de protéines serait même nécessaire à la formation adéquate des tubules de rein (Pollack A.L. et al., 1998). De ce fait, Pollack a montré que la polarité de ces cellules épithéliales *in vitro* est réorganisée temporairement au cours de la tubulogénèse. De plus, Bukanov N.O. et al. en 2002 ont démontré *in vitro* que la polycystine-1 passe d'une localisation intracellulaire à une localisation à la jonction cellule-cellule une fois les cellules tubulaires polarisées et les lumières tubulaires formées. Cette perte de polarité des cellules épithéliales représente un facteur clé à la réorganisation de structures lors de la tubulogénèse du rein mais également

durant le développement de d'autres tissus épithéliaux (Low S.H. et al., 2000 ; Sorokin L. et Ekblom P., 1992 ; Birchmeier W. et al., 1996).

Ces observations pourraient bien corrélérer avec la localisation de l'expression de la polycystine-1 dans les modèles cellulaires intestinaux *in vitro*. Dans les cellules non-polarisées HIEC, la polycystine-1 se retrouve au niveau intracellulaire tandis qu'une localisation au contact cellule-cellule est observable pour les cellules polarisées, Caco-2/15. La localisation de la polycystine-1 au niveau intracellulaire des cellules HIEC, cellules représentant les cellules non-polarisées du fond de la crypte, pourrait se rapporter au caractère prolifératif que requière l'axe crypte-villosité pour le renouvellement des cellules épithéliales. Les cellules épithéliales intestinales ont la capacité de se renouveler constamment comparativement à la plupart des cellules épithéliales des autres organes matures fonctionnels (Balkovetz D.F., 1998). Par exemple, les cellules épithéliales de tubules rénaux, à l'atteinte de la croissance finale du rein, atteignent toutes une différenciation terminale et une localisation au contact cellule-cellule de la polycystine-1 comme pour les cellules Caco-2/15. Ces cellules demeurent immobiles sauf si leur régénération est nécessaire suite à une lésion rénale (Balkovetz D.F., 1998). Dans l'intestin, la présence de cellules épithéliales prolifératives au bas de la crypte est nécessaire au cours de toute la vie. Même après l'ajout de une expression forcée de la E-cadhérine dans les HIEC, la polycystine-1 reste localisée au niveau intracellulaire. Il est envisageable de penser que ces cellules

épithéliales intestinales ne possède pas tous les composants nécessaires à l'atteinte d'une polarité ou d'une différenciation afin de conserver justement leur fonction à la base du renouvellement cellulaire. Pour leur part, il est bien connu que les cellules mésenchymateuses du rein acquièrent une polarité et des caractéristiques de l'épithélium par le changement au niveau de la composition de la matrice extracellulaire, des molécules d'adhésion et des intégrines (Biologie du développement, les grands principes, Lewis Wolpert, 1998). La présence de la polycystine-1 au niveau intracellulaire suggèrent donc que cette dernière pourrait être associée in vitro aux cellules épithéliales prolifératives et non polarisées.

3. La localisation de la polycystine-1 au niveau des jonctions intercellulaires pourrait l'impliquer dans l'adhésion cellulaire et la signalisation.

La localisation de la polycystine-1 dans les jonctions intercellulaires suggère un rôle pour cette dernière dans l'adhésion cellulaire et/ou dans la signalisation des cellules épithéliales de l'intestin humain.

3.1 Adhésion cellulaire

Tout d'abord, la polycystine-1 au niveau de l'intestin pourrait être impliquée dans l'adhésion cellulaire, comme molécule d'adhésion. Huan et Van Adelsberg ont démontré, en 1999, la localisation de la polycystine-1 dans un

complexe contenant la E-cadhérine et des caténines des jonctions adhérentes dans les cellules rénales. De plus, Roitback T. et al. ont prouvé en 2004 que la polycystine-1 mutée des cellules ADPKD est incapable de reformer le complexe avec la E-cadhérine. L'adhésion cellule-cellule et la signalisation de la polycystine-1 sont altérés amenant ainsi à un phénotype cellulaire partiellement dédifférencié. Le complexe E-cadhérine/caténines joue un rôle crucial dans la stabilisation de l'adhésion par sa liaison au cytosquelette (Yap A.S. et al., 1997; Angst B.D. et al., 2001; Gottardi C.J. et al., 2001), et également dans la modulation de signaux de transduction impliquée dans l'expression de gène et du contrôle du cycle cellulaire (St-Amand A.L. et klymkowsky M.W., 2001). Au niveau de l'intestin, il a été démontré que la stabilisation des jonctions adhérentes par l'engagement de la E-cadhérine et les voies de signalisation qui agissent en aval de cette dernière ont une importance majeure dans la prolifération et la différenciation morphologique et fonctionnelle des entérocytes. Une co-localisation partielle de la polycystine-1 avec la E-cadhérine est observée dans les cellules polarisées Caco-2/15 et dans les tissus intestinaux humains. Cette co-localisation est conservée même après un traitement au Triton X-100 1% et lors des expériences d'altération et de restauration des jonctions intercellulaires en variant la concentration calcique dans le milieu des cellules Caco-2/15. C'est donc une première évidence que la polycystine-1 pourrait être impliquée dans l'adhésion cellulaire au niveau du complexe comprenant la E-cadhérine dans les cellules épithéliales de l'intestin humain.

La polycystine-1 pourrait également se localiser au niveau des desmosomes afin d'assurer la signalisation pour l'adhésion cellulaire (Scheffers M.S. et al., 2000 ; Ibraghimov-Beskrovnaya O. et al., 2000). Cependant, Scheffers et al. en 2000 ont démontré que la polycystine-1 n'est pas impliquée dans la formation des desmosomes des cellules rénales. Par contre, les mécanismes généraux de l'assemblage et de la formation des contacts cellule-cellule stable des desmosomes ne sont pas encore connus (Huber O., 2003). Des « cross-talk » entre les jonctions adhérentes et les desmosomes sont cependant une hypothèse émise par Huen en 2002. Comme la polycystine-1 est présente dans les desmosomes de façon systématique tout le long de l'axe crypte-villosité, un rôle pour cette dernière dans le maintien des desmosomes dans l'épithélium intestinal humain pourrait être envisagé.

3.2 Les voies de signalisation

Le domaine C-terminal de la polycystine-1 peut activer plusieurs voies de signalisation impliqués dans la morphogenèse et dans la prolifération des cellules épithéliales de rein (Nickel C. et al., 2002; Sutters et al., 2001). La localisation de la polycystine-1 au niveau des jonctions adhérentes dans un complexe comprenant la E-cadhérine et des caténines et dans les desmosomes au niveau de l'épithélium intestinal est des plus intéressante afin de l'impliquer aussi dans la signalisation des cellules épithéliales de l'intestin. La polycystine-

1 au niveau du rein est impliquée dans l'activation de la voie de signalisation Wnt via la stabilisation de la β -caténine et de l'activation des facteurs de transcription TCF-LEF(Kim E. et al., 1999). Cette étude a démontré que la polycystine-1 est capable de moduler la signalisation Wnt pendant le développement du rein. La morphogenèse rénale est régie par certains membres de la famille des Wnt, dont Wnt 4 et Wnt 11 (Kim E., et al., 1999). La voie Wnt/ β -caténine joue également un rôle majeur dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin. Son incidence de mutations atteint même les 80% dans les cancers colorectaux (Morin P.J., 1999; Babyatsky M. W. et Podolsky D.K., 1999). Il serait donc possible de penser à l'implication de la polycystine-1 dans la régulation de la voie de signalisation Wnt dans l'épithélium intestinal humain. L'implication du domaine en C-terminal de la polycystine-1 dans la régulation des protéines G a aussi été démontrée dans le rein et pourrait également se retrouver au niveau de l'épithélium intestinal. Des études ont illustré que la polycystine-1 peut se lier et activer les protéines hétérotrimériques G_i/G_o in vitro (Parnell S.C., 1998; Parnell S.C. et al., 2002; Kim E. et al., 1999). Les protéines G hétérotrimériques sont aussi impliquées dans l'activation de c-Jun N-terminal et le facteur de transcription AP-1 par la polycystine-1 (Parnell S., 2002). De plus, Le N.H. et al. en 2004 a démontré effectivement que l'activité adéquate de AP-1 nécessiterait l'expression de cette dernière. Selon leur conditions expérimentales, la voie de signalisation Wnt n'est en rien affectée par une expression aberrante de la polycystine-1.

Les protéines G régulent des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la polarité et la différenciation (Grantham J.J., 2001).

4. Le cilium primaire est un organe associé au fond de la crypte dans l'épithélium intestinal humain.

Par l'utilisation d'un anticorps monoclonal contre la tubuline- α acétylée et qui reconnaît le cilium primaire, nous avons démontré la présence du cilium primaire dans l'épithélium intestinal humain. La seule autre évidence du cilium primaire dans l'épithélium intestinal été réalisée 25 ans plus tôt, soit en 1978 par Moxey et Trier sur un spécimen de 9 semaines. De plus, la présence de cette organe a clairement été démontrée dans notre étude comme étant une structure associée à des cellules épithéliales du fond de la crypte dans l'épithélium intestinal humain tant *in vivo* qu'*in vitro*.

Par son état fonctionnel dans le modèle cellulaire intestinal HIEC et sa localisation au niveau des cellules épithéliales de la crypte dans l'épithélium intestinal humain *in vivo* et *in vitro*, le cilium primaire pourrait possiblement jouer plusieurs rôles. Un rôle majeur d'antenne sensorielle de l'environnement extracellulaire a été suggéré pour le cilium primaire (Roth K.E. et al., 1988; Schwartz E.A. et al., 1997; Praetorius HA et Spring K.R., 2001). Étant donné la présence de cilia primaires à la surface des cellules épithéliales du fond de la crypte, cellules très éloignées de la lumière intestinale, on pourrait supposer que le cilium primaire jouerait un rôle de régulateur dans la sensibilité des cellules épithéliales pour des molécules chimiques, des facteurs et d'autres substances (Wheatley et al., 1996). De plus, les cellules épithéliales du fond de

la crypte intestinale pourraient représenter les cellules guides, qui contrôlent par leur contact avec le milieu la régulation de la prolifération cellulaire au niveau de l'axe crypte-villosité. Pazour et Witman affirment que le cilium primaire possède des récepteurs associés avec le contrôle de la prolifération et/ou de l'apoptose. Le récepteur SST₃ de la somatostatine (Bousquet C. et al., 2001) et le récepteur 5-HT₆ sérotonine (Brailov I et al., 2000) au niveau du cilium primaire dans le cerveau en sont deux exemples. Le cilium primaire pourrait donc être associé aux cellules prolifératives de la crypte qui in vitro sont représentées par les cellules HIEC.

Deuxièmement, au niveau des tissus intestinaux adultes humains, la présence unique d'un cilium primaire à la surface d'une cellule épithéliale du fond de la crypte a été localisé dans quelques cryptes de tissus adultes. Ceci pourrait bien s'apparenter à une structure unique aux cellules souches. Il serait possible également de dire que le cilium primaire se retrouve chez plusieurs cellules de la crypte fœtale pour justement bien réguler le développement et augmenter le contact avec les composantes de la lumière intestinale. Une fois le développement terminé, la régulation de la prolifération s'effectuerait uniquement par une cellule épithéliale possédant un cilium primaire et ce pouvant être une cellule souche. Cette structure serait donc associée aux cellules vitales de l'axe crypte-villosité tout au long du développement, tant au stade fœtal qu'adulte. Le marquage diffus observé dans les cryptes fœtales aussi pourrait être lié à l'étape de maturation du cilium primaire. Il est important de mentionner que la probabilité de voir un cilium primaire au

niveau de l'épithélium intestinal est faible. Wheatly et al., en 1996, avait rapporté l'intestin comme ne possédant pas de cilium primaire puisqu'aucune étude avait réellement prouvé jusqu'à maintenant sa présence dans l'intestin. Le cilium primaire est présent uniquement au niveau des cellules épithéliales de la crypte et dans le modèle cellulaire HIEC. Les cellules Caco-2/15 ne possèdent pas de cilium primaire, ceci corrélant avec le marquage observé au niveau des cellules épithéliales de la villosité de l'intestin humain. L'ensemble de ces résultats démontrent bien la régulation étroite du développement de cette organe et son importance probable au bon fonctionnement de l'intestin grêle.

5. Pourquoi n'y a-t-il pas de phénotype kystique dans l'épithélium intestinal humain?

Tel que mentionné à la section 4, les cellules épithéliales de la villosité de l'intestin grêle humain *in vivo* et *in vitro* ne possèdent pas de cilium primaire à leur surface apicale. La polycystine-1 et d'autres protéines impliquées dans l'ADPKD ont été localisées sur le cilium primaire de cellules épithéliales de rein (Nauli S.M. et al., 2003; Yoder B.K. et al., 2002). Ce cilium primaire semble remplir une fonction de mécanorécepteur possiblement utile dans la transduction de signaux cellulaires (Joly D., 2003). Le cilium primaire pourrait représenter une voie parallèle de signalisation à celle retrouvée, par exemple, au niveau des jonctions cellule-cellule qui contrôlent des fonctions cellulaires majeures telles que l'adhésion, l'apoptose, la prolifération et la différenciation

cellulaire et permettre ainsi la dédifférenciation partielle. Comme les cellules de la villosité n'ont pas de cilium primaire, le rôle de la polycystine-1 se limite aux jonctions cellulaires. De plus, comme les cellules du fond de la crypte sont vitales, des mécanismes très régulés, comme l'apoptose, sont continuellement en marche pour enlever et renouveler les cellules inadéquates. Le phénotype kystiques observé dans les tubules rénaux pourrait possiblement être attribué à la perte ou à la d'une dysfonction (par mutation de protéines) du cilium primaire des cellules épithéliales.

6. La polycystine-1 à la base du cilium primaire intestinal pourrait être fonctionnelle.

Avant la fin des années 90, le cilium primaire était vu comme un organe inutile, vestigial probablement. Son importance fit surface lorsque des études dans plusieurs organismes vivants ont montré que le développement de certaines maladies est relié à des défauts de structures ou de fonctions du cilium primaire. (Ong A.C. et Wheatley D.N., 2003). Yoder et al. ont prouvé en 2002 que la polycystine-1 et la polycystine-2 sont localisées sur les cilia primaires de cellules rénales épithéliales en culture. De plus, Nauli et al. en 2003 ont montré que la polycystine-1 et la polycystine-2 sur le cilium primaire fonctionnent comme des mécanorécepteurs. Étant donné la localisation de la polycystine-1 au niveau du cilium primaire dans le rein (Nauli S.M. et al., 2003; Yoder B.K. et al., 2002), nous avons vérifié la localisation de cette dernière au

niveau du cilium primaire des cellules épithéliales de la crypte de l'intestin grêle humain in vitro. La polycystine-1 a été localisée à la base du cilium primaire dans les cellules HIEC. Il reste maintenant à savoir si la polycystine-1 au niveau du cilium primaire des cellules épithéliales de l'épithélium intestinal humain est fonctionnelle. Comme le cilium primaire des HIEC est fonctionnel par expérience de perfusion, les protéines qui le composent le devraient aussi puisqu'une mutation de protéines d'importance amène à son incapacité de répondre au flux. Si la fonctionnalité de la polycystine-1 ou la polycystine-2 est mise en cause, la réponse au flux est abolie et la fonction de mécanorécepteur également (Nauli S.M. et al., 2003). L'équipe du Dr. Zhou a également rapporté que la polycystine-1 et la polycystine-2 doivent agir de pair pour activer des voies de mécanotransduction (Nauli S.M. et al., 2003). Des expériences à savoir si la polycystine-1 se retrouve de pair avec la polycystine-2 dans notre modèle cellulaire devront donc être réalisées.

V-CONCLUSION

La polycystine-1(PC-1) joue un rôle dans la formation et le maintien de la cytoarchitecture des cellules épithéliales de rein par sa localisation au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes, mais aussi au niveau du cilium primaire. Elle est impliquée dans plusieurs voies de signalisation et dans l'adhésion cellulaire. Une mutation de la polycystine-1 au niveau du système rénal provoque l'apparition d'une maladie génétique grave, la polykystose rénale autosomique dominante. Nos études ont permis d'identifier et de caractériser pour la première fois cette même protéine au niveau de l'épithélium intestinal humain. Dans les tissus intestinaux humains, la polycystine-1 est exprimée tout le long de l'axe crypte-villosité et ce peu importe le stade de développement de l'intestin. De plus, la polycystine-1 se retrouve au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes *in vivo* et dans le modèle cellulaire intestinal Caco-2/15. Ceci a été démontré par une co-localisation avec des molécules de jonctions qui demeure même après un traitement au Triton X-100 1% et par l'inhibition et la restauration des jonctions intercellulaire dans les cellules Caco-2/15. Sa localisation varie *in vitro* selon la polarité des cellules épithéliales intestinales. Pour les cellules HIEC non-polarisées, la polycystine-1 se localise au niveau intracellulaire. Pour les cellules polarisées, les Caco-2/15, la polycystine-1 se retrouve au contact cellule-cellule. Cette localisation au niveau des jonctions intercellulaires *in vivo* et dans les cellules Caco-2/15 lui confère possiblement un rôle dans

certaines voies de signalisation, dans l'adhésion et dans le maintien des desmosomes. De plus, la présence d'un cilium primaire dans les cryptes de cellules épithéliales intestinales humaines *in vivo* et même fonctionnel *in vitro* amène une autre voie très intéressante à l'étude de la polycystine-1 dans les cellules de l'épithélium intestinal humain. Ce cilium primaire pourrait se retrouver à la surface des cellules épithéliales de la crypte intestinale ou des cellules souches comme senseur de flux pour guider les autres cellules de l'axe crypte-villosité dans le processus de la prolifération cellulaire intestinale. La polycystine-1 présente à la base du cilium primaire des cellules intestinales HIEC pourrait aussi être impliquée dans les processus cellulaires tels que la polarité, la prolifération et la différenciation! Il serait donc important d'élucider les fonctions possibles de la polycystine-1 au niveau des jonctions intercellulaires et le cilium primaire par des transfections transitoires de dominants négatifs et de surexpressions. Il serait également intéressant d'étudier l'expression et la localisation de la polycystine-2 dans l'épithélium intestinal humain pour vérifier une collaboration éventuelle entre ces deux polycystines dans les processus cellulaires. Nous espérons donc par l'étude des polycystines 1 et 2 au niveau de l'épithélium intestinal élucider et comprendre d'avantage certains mécanismes d'action de ces dernières dans l'apparition de la polykystose rénale autosomique dominante.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mes co-directeurs de recherche, les Drs Jean-François Beaulieu et Nuria Basora pour m'avoir encouragé et permis de travailler sur un projet aussi stimulant. Chaque petit pas dans ce projet a été aussi surprenant qu'intéressant!

J'aimerais remercier Denis Martel et Charles Bertrand pour leur excellent travail en microscopie électronique. On ne serait compter les heures de travail que représente chacune des photos en microscopie électronique de cette étude! J'aimerais également remercier Pierre Pothier pour son support technique en microscopie à fluorescence.

Je tiens à remercier Marie-Pier Tétreault pour le travail exceptionnel fait dans les études de perfusion.

Mes remerciements vont également aux assistants de recherche, Elizabeth Herring et Rémy Gauthier, à tous les étudiants du laboratoire et aux personnes du département d'anatomie et de biologie cellulaire. Vous êtes tous des gens merveilleux et ce fut un plaisir et même un privilège de travailler avec vous !

Finalement je remercie mon copain, Maxime, que j'adore profondément, pour m'avoir supporté, écouté et encouragé tout le long de ma maîtrise.

Merci !

BIBLIOGRAPHIE

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. Et Walter P., Molecular biology of the cell, Garland science, 4^{ième} édition, 2002, p.1073.

Angst B.D., Marcozzi C. et Magee A.I. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. J Cell Sci. 114: 629-641.

Babyatsky M.W. et Podolsky D.K. 1999. Growth and development of the gastrointestinal tract. Textbook of gastroenterology, 3rd ed.: 547-584.

Balkovetz D.F. 1998. Hepatocyte growth factor and Madin-Darby canine kidney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. Microsc Res Tech. 43 :456-463.

Beaulieu J.F. et Quaroni A. 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. Biochem J.280:599-608.

Bhunia A.K., Piontek K., Boletta A., Liu L., Qian F., Xu P.N., Germino F.J. et Germino G.G. 2002. PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. Cell. 20:157-168.

Birchmeier W., Behrens J., Weidner K.M., Hulsken J. et Birchmeier C. 1996. Epithelial differentiation and the control of metastasis in carcinomas. Curr Top Microbiol Immunol. 213:117-135.

Boletta A, Qian F, Onuchic LF, Bhunia AK, Phakdeekitcharoen B, Hanaoka K, Guggino W, Monaco L, Germino GG. 2002. Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. Mol Cell. 6:1267-1273.

Bousquet C., Puente E., Buscail L., Vaysse N. et Susini C. 2001. Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. Chemotherapy. 47:30-39.

Brailov I., Bancila M., Brisorgueil M.J., Miquel M.C., Hamon M. et Verge D. 2000. Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. Brain Res. 872:271-275.

Brittan M. et Wright N.A. 2002. Gastrointestinal stem cells. J Pathol. 197:492-509.

Bukanov N.O., Husson H., Dackowski W.R., Lawrence B.D., Clow P.A., Roberts B.L., Klinger K.W. et Ibraghimov-Beskrovnya O. 2002. Functional polycystin-1 expression is developmentally regulated during epithelial morphogenesis in

vitro: downregulation and loss of membrane localization during cystogenesis. *Hum Mol Gen.* 11: 923-936.

Cantiello H.F. 2003. A tale of two tails: ciliary mechanotransduction in ADPKD. *Trends Mol Med.* 9:234-236.

Cereijido M., Shoshani L. et Contreras R.G. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279:477-482.

Charron AJ, Nakamura S, Bacallao R, Wandering-Ness A. 2000. Compromised cytoarchitecture and polarized trafficking in autosomal dominant polycystic kidney disease cells. *J Cell Biol.* 149:111-124.

Chauvet V., Qian F., Boute N., Cai Y., Phakdeekitacharoen B., Onuchic L.F., Attie-Bitach T., Guicharnaud L., Devuyst O., Germino G.G. et Gubler M.C. 2002. Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. *Am J Pathol.* 160:973-983.

Du J. et Wilson PD. 1995. Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD. *Am J Physiol.* 269:487-495.

Duchesne C., Charland S., Asselin C., Nahmias C. et Rivard N. 2003. Negative regulation of beta-catenin signaling by tyrosine phosphatase SHP-1 in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 278 :14274-14283.

Gabow P.A. 1993. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 22:511-522.

Gallagher A.R., Hidaka S., Gretz N. et Witzgall R. 2002 Molecular basis of autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Cell Mol Life Sci.* 59:682-693.

Gottardi CJ, Gumbiner BM. 2001. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol.* 11:R792-794.

Geng L., Segal Y., Pavlova A., Barros E.J., Lohning C., Lu W., Nigam S.K., Frischauf A.M., Reeders S.T. et Zhou J. 1997. Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am J Physiol.* 272:F451-459.

Germino G.G. 1997. Autosomal dominant polycystic kidney disease: a two-hit model. *Hosp Pract (Off Ed).* 32:81-82, 85-88, 91-92

Grantham J.J. 2001 Polycystic kidney disease: from the bedside to the gene and back. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10:533-542.

Huan Y. et Van Adelsberg J. 1999. Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest.* 104:1459-1468.

Huber O. 2003. Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 60:1872-1890.

Huen A.C., Park J.K., Godsel L.M., Chen X., Bannon L.J., Amargo E.V., Hudson T.Y., Mongiu A.K., Leigh I.M., Kelsell D.P., Gumbiner B.M. et Green K.J. 2002. Intermediate filament-membrane attachments function synergistically with actin-dependent contacts to regulate intercellular adhesive strength. *J Cell Biol.* 159:1005-1017.

Hulsken J., Birchmeier W. et Behrens J. 1994. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 127:2061-2069.

Ibraghimov-Beskrovnaya O., Bukanov N.O., Donohue L.C., Dackowski W.R., Klinger K.W. et Landes G.M. 2000. Strong homophilic interactions of the Ig-like domains of polycystin-1, the protein product of an autosomal dominant polycystic kidney disease gene, PKD1. *Hum Mol Genet.* 9:1641-1649.

Ibraghimov-Beskrovnaya O., Dackowski W.R., Foggensteiner L., Coleman N., Thiru S., Petry L.R., Burn T.C., Connors T.D., Van Raay T., Bradley J., Qian F., Onuchic L.F., Watnick T.J., Piontek K., Hakim R.M., Landes G.M., Germino G.G., Sandford R. et Klinger K.W. 1997. Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 :6397-6402.

Igarashi P. et Somlo S. 2002. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 13:2384-2398.

Ikeda M. et Guggino W.B. 2002. Do polycystins function as cation channels? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 11:539-545

International polycystic kidney disease consortium. 1995. Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell.* 81:289-298.

Joly D., Hummel A., Ruello A. et Knebelmann B. 2003. Ciliary function of polycystins: a new model for cystogenesis. *Nephrol Dial Transplant.* 18:1689-1692.

Jones J.C. et Goldman R.D. 1985. Intermediate filaments and the initiation of desmosome assembly. *J Cell Biol.* 101:506-517.

Kim K., Drummond I., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Klinger K. et Arnaout M.A. 2000. Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1731-1736.

Kim E., Arnould T., Sellin L.K., Benzing T., Fan M.J., Gruning W., Sokol S.Y., Drummond I. et Walz G. 1999. The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem.* 274:4947-4953.

Krasnoperov V.G., Bittner M.A., Beavis R., Kuang Y., Salnikow K.V., Chepurny O.G., Little A.R., Plotnikov A.N., Wu D., Holz R.W. et Petrenko A.G. 1997. alpha-Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron.* 18:925-937.

Laprise P., Chailier P., Houde M., Beaulieu J.F., Boucher M.J. et Rivard N. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem.* 277:8226-8234.

Le Gall A.H., Yeaman C., Muesch A. et Rodriguez-Boulan E. 1995. Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin Nephrol.* 15:272-284.

Le N.H., van der Bent P., Huls G., van de Wetering M., Loghman-Adham M., Ong A.C., Calvet J.P., Clevers H., Breuning M.H., van Dam H. et Peters D.J. 2004. Aberrant polycystin-1 expression results in modification of activator protein-1 activity, whereas Wnt signaling remains unaffected. *J Biol Chem.* 279:27472-27481.

Low S.H., Miura M., Roche P.A., Valdez A.C., Mostov K.E. et Weimbs T. 2000. Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity. *Mol Biol Cell.* 11:3045-3060.

Lu W., Peissel B., Babakhanlou H., Pavlova A., Geng L., Fan X., Larson C., Brent G. et Zhou J. 1997. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation. *Nat Genet.* 17:179-181.

Mattey D.L. et Garrod D.R. 1986. Calcium-induced desmosome formation in cultured kidney epithelial cells. *J Cell Sci.* 85:95-111.

Montesano R., Schaller G. et Orci L. 1991. Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Cell.* 66:697-711.

Morin P.J. 1999. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 21:1021-1030.

Moxey C.P. et Trier J.S. 1978. Specialized cell types in the human fetal small intestine. *Anat Rec.* 191:269-285.

Nauli S.M, Alenghat F.J., Luo Y., Williams E., Vassilev P., Li X., Elia A.E., Lu W., Brown E.M., Quinn S.J., Ingber D.E. et Zhou J. 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 33:129-137.

Newby J.N., Streets A.J., Zhao Y., Harris P.C., Ward C.J., Ong A.C. 2002. Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J Biol Chem.* 277:20763-20773.

Nickel C., Benzing T., Sellin L., Gerke P., Karihaloo A., Liu Z.X., Cantley L.G. et Walz G. 2002. The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells. *J Clin Invest.* 109:481-489.

Ong A.C. et Wheatley D.N. 2003. Polycystic kidney disease : the ciliary connection. *Lancet.* 361:774-776.

Pageot L.P., Perreault N., Basora N., Francoeur C., Magny P. et Beaulieu J.F. 2000. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech.* 49:394-406.

Palsson R., Sharma C.P., Kim K., McLaughlin M., Brown D., Arnaout M.A. 1996. Characterization and cell distribution of polycystin, the product of autosomal dominant polycystic kidney disease gene 1. *Mol Med.* 2:702-711.

Parnell S.C., Magenheimer B.S., Maser R.L., Zien C.A., Frischauf A.M. et Calvet J.P. 2002. Polycystin-1 activation of c-Jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem.* 277:19566-19572.

Parnell S.C., Magenheimer B.S., Maser R.L., Rankin C.A., Smine A., Okamoto T. et Calvet JP. 1998. The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 251:625-631.

Pazour G.J. et Rosenbaum J.L.. 2002. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.* 12:551-555.

Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. 1999. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem.* 274:19347-19351.

Pei Y. 2001. A "two-hit" model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease? *Trends Mol Med.* 7:151-156.

- Perez-Moreno M., Jamora C. et Fuchs E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*. 112:535-548.
- Perreault N. et Beaulieu J.F. 1996. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res*. 224:354-364.
- Perrone R.D. 1997. Extrarenal manifestations of ADPKD. *Kidney Int*. 51:2022-2036.
- Peters D.J., Van de Wal A., Spruit L., Saris J.J., Breuning M.H., Bruijn J.A. et De Heer E. 1999. Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J Pathol*. 188:439-446.
- Peters D.J.M., Spruit L., Klingel R., Prins F., Baelde H.J., Giordano P.C., Bernini L.F., de Heer E., Breuning M.H. et Bruijn JA. 1996. Adult, fetal, and polycystic kidney expression of polycystin, the polycystic kidney disease-1 gene product. *Lab Invest*. 75:221-230.
- Peterson G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 83:346-356.
- Pollack A.L., Runyan R.B., Mostov K.E. 1998. Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged without loss of cell-cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced tubulogenesis. *Dev Biol*. 204:64-79.
- Praetorius H.A. et Spring K.R. 2001. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol*. 184:71-79.
- Praetorius H.A. et Spring K.R. 2003. The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 12:517-520.
- Praetorius H.A. et Spring K.R. 2003. Removal of the MDCK cell primary cilium abolishes flow sensing. *J Membr Biol*. 191:69-76.
- Qian F., Boletta A., Bhunia A.K., Xu H., Liu L., Ahrabi A.K., Watnick T.J., Zhou F., Germino G.G. 2002. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:16981-16986.
- Reeders S.T. 1992. Multilocus polycystic disease. *Nat Genet*. 1:235-237.
- Reeders S.T, Breuning M.H., Davies K.E., Nicholls R.D., Jarman A.P., Higgs D.R., Pearson P.L. et Weatherall D.J. 1985. A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature*. 317:542-544.

Roitbak T., Ward C.J., Harris P.C., Bacallao R., Ness S.A. et Wandering-Ness A. 2004. A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol Biol Cell*. 15:1334-1346.

Rossetti S., Chauveau D., Walker D., Saggar-Malik A., Winearls C.G., Torres V.E. et Harris P.C. 2002. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int*. 61:1588-1599.

Roth K.E., Rieder C.L. et Bowser S.S. 1988. Flexible-substratum technique for viewing cells from the side: some in vivo properties of primary (9+0) cilia in cultured kidney epithelia. *J Cell Sci*. 89:457-466.

Scheffers M.S., Van der Bent P., Prins F., Spruit L., Breuning M.H., Litvinov S.V., De Heer E. et Peters D.J. 2000. Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. *Hum Mol Genet*. 9:2743-2750.

Schwartz E.A., Leonard M.L., Bizios R. et Bowser S.S. 1997. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am J Physiol*. 272:132-138.

Sorokin L. et Ekblom P. 1992. Development of tubular and glomerular cells of the kidney. *Kidney Int*. 41:657-664.

Stein M., Wandering-Ness A. et Roitbak T. 2002. Altered trafficking and epithelial cell polarity in disease. *Trends Cell Biol*. 12:374-381.

St Amand A.L. et Klymkowsky M.W. 2001. Cadherins and catenins, Wnts and SOXs: embryonic patterning in *Xenopus*. *Int Rev Cytol*. 203:291-355.

Sutters M. et Germino G.G. 2003. Autosomal dominant polycystic kidney disease. molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med*. 141:91-101.

Thomas J.O. et Kornberg R.D. 1975. Cleavable cross-links in the analysis of histone-histone associations. *FEBS Lett*. 58:353-358.

Vachon P.H., Perreault N., Magny P. et Beaulieu J.F. 1996. Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J Cell Physiol*. 166:198-207.

Van Adelsberg J., Chamberlain S. et D'Agati V. 1997. Polycystin expression is temporally and spatially regulated during renal development. *Am J Physiol*. 272:F602-609.

Volberg T., Geiger B., Kartenbeck J. et Franke W.W. 1986. Changes in membrane-microfilament interaction in intercellular adherens junctions upon removal of extracellular Ca^{2+} ions. *J Cell Biol.* 102:1832-1842.

Ward C.J., Turley H., Ong A.C., Comley M., Biddolph S., Chetty R., Ratcliffe P.J., Gattner K. et Harris PC. 1996. Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1524-1528.

Weston B.S., Jeffery S., Jeffrey I., Sharaf S.F., Carter N., Saggar-Malik A. et Price R.G. 1997. Polycystin expression during embryonic development of human kidney in adult tissues and ADPKD tissue. *Histochem J.* 29:847-856.

Wheatley D.N., Wang A.M., Strugnell G.E. 1996. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int.* 20:73-81.

Wilson P.D. 1991. Aberrant epithelial cell growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 17:634-637.

Yang H., jiang D., Li W., Liang J., Gentry L.E. et brattain M.G. 2000. defective cleavage of membrane bound TGF α leads tu enhanced activation of the EGF receptor in malignant cells. *Oncogene.* 19:1901-1914.

Yap A.S., Briher W.M. et Gumbiner B.M. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13: 119-46.

Yoder B.K., Hou X. et Guay-Woodford L.M. 2002. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol.* 13:2508-2516.

Zimmerman K.W. 1898. beitrage zur kenntniss einiger drusen und epithelien. *Arch. Mikroskop. At.* 52:552-706.